



**Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur
Strasbourg I**

Discipline:

Sciences du vivant

Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

par

Laurent Tremuth

**Le rôle de la taline dans la connexion des intégrines au
cytosquelette – une étude structurale et fonctionnelle**

Soutenue publiquement le mercredi 1^{er} décembre 2004

Membres du jury

Directeur de Thèse ☐	Monsieur Kenneth Takeda, Dr, Université Louis Pasteur (Strasbourg I)
Co-directeur de Thèse ☐	Madame Nelly Kieffer, Professeur, Université du Luxembourg
Rapporteur interne ☐	Madame Elisabeth Georges-Labouesse, Dr, Université Louis Pasteur (Strasbourg I)
Rapporteur externe ☐	Monsieur Marc Block, Professeur, Université Joseph Fourier (Grenoble I)
Rapporteur externe ☐	Monsieur Pierre Jurdic, Dr, École Normale Supérieure de Lyon
Examineur ☐	Monsieur Jan de Mey, Professeur, Université Louis Pasteur (Strasbourg I)

REMERCIEMENTS

Je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance à mes directeurs de thèse Madame le Professeur Nelly Kieffer et Monsieur le Docteur Kenneth Takeda de m'avoir accueilli au sein de leurs équipes de recherche et d'avoir mis à ma disposition les moyens matériels et scientifiques pour réaliser ce travail de thèse. Ils ont su me guider et conseiller tout au long de ces trois années. Merci pour votre disponibilité inconditionnelle et merci pour la confiance que vous m'avez portée.

J'adresse ma profonde gratitude à Madame le Docteur Elisabeth Georges-Labouesse, Monsieur le Professeur Jan de Mey, Monsieur le Professeur Marc Block et Monsieur le Docteur Pierre Jurdic de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Un grand merci également au Docteur Philippe Rondé pour son aide au microscope confocal et la mise en œuvre de la technique du FRET ainsi qu'à Snezana Mancic pour son aide lors de l'analyse d'images.

Je souhaite sincèrement remercier Monsieur le Docteur Johan Hoebeke pour sa collaboration scientifique concernant les expériences de SPR.

J'adresse de sincères remerciements aux Docteurs Sylviane Muller et Jean-Paul Briand pour leur collaboration scientifique concernant les peptides synthétiques de taline.

Je voudrais remercier tous les membres, actuels et anciens, du LBPI pour leur soutien moral et scientifique et pour les bons moments qu'on a pu passer ensemble. Merci à Laurent Vallar qui m'a aidé lors de mes premiers pas au laboratoire, à Stephanie pour les discussions intéressantes et inspirantes, pour ses conseils scientifiques et humains

ainsi que pour sa contribution aux expériences de ce travail, à Martine pour sa bonne humeur inépuisable, à Sébastien pour son enthousiasme permanent, sa rigueur et son aide lors des expériences de cytométrie, à Chantal pour l'encadrement en biologie moléculaire et sa contribution aux expériences de SPR, à Fanny pour son aide précieuse concernant la bioinformatique, à Christiane, Elisabeth et René, à Maura, Danijela, Christine, Michèle, Sandra, Alexandre et Fabrice pour les bons moments qu'on a passés ensemble.

Je tiens à remercier toute l'équipe UMR CNRS 7034 du Docteur Kenneth Takeda à Strasbourg. Ils ont su m'accueillir chaleureusement lors de mes passages (malheureusement trop rares) au laboratoire.

J'adresse mes sincères remerciements au Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour son soutien financier sans lequel ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Je souhaite également remercier de tout mon cœur mes parents ainsi que Charlene, Deborah et Gerd. Sans leur support moral et matériel, la réalisation de ce travail ne m'aurait pas été possible.

Finalement, un très grand merci à Carmie. Elle a su me soutenir et reconforter avec une patience et une endurance sans égal pendant ces dernières années. Merci d'avoir enduré mes humeurs et d'avoir soigné mes plaies et merci de partager les moments de bonheur avec moi.

Ce travail a été réalisé de novembre 2001 à décembre 2004 au Laboratoire de Biologie et Physiologie Intégrée (LBPI), anciennement Laboratoire Franco-Luxembourgeois de Recherche Biomédicale (LFL) à l'Université du Luxembourg.

RESUME

La taline est une protéine multifonctionnelle du cytosquelette qui joue un rôle important dans la connexion du cytosquelette d'actine à une famille de récepteurs membranaires d'adhésion, les intégrines. La taline contient deux sites d'interaction avec les intégrines, un premier au niveau de son domaine globulaire et un deuxième au niveau de son domaine élongé. L'objectif de ce travail de thèse de doctorat était de caractériser le site d'interaction du domaine élongé de la taline avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, au niveau structural et fonctionnel, et de définir la séquence minimale d'interaction. Pour atteindre ce but, trois approches différentes ont été choisies : i) une approche bioinformatique d'analyse de séquence, ii) une approche cellulaire *in vivo*, étudiant a) la localisation subcellulaire de fragments recombinants de la taline, fusionnés à DsRed, dans des cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$ -GFP et b) l'interaction de ces fragments avec l'intégrine par la technique du FRET (fluorescence resonance energy transfer) et finalement iii) une approche biochimique *in vitro* d'expériences de copréciptation et d'interaction protéine-protéine par SPR (surface plasmon resonance) pour confirmer et caractériser l'interaction des fragments de taline avec l'intégrine. La combinaison de ces trois approches nous a permis i) de délimiter précisément un site d'interaction avec la sous-unité β_3 de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ à une séquence de 42 acides aminés (résidus 2072 à 2113) au niveau du domaine élongé de la taline, ii) de définir par SPR l'affinité pour β_3 des fragments de taline contenant le premier ($K_D=9,7 \pm 1,6 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$) ou le deuxième ($K_D=6,3 \pm 6,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) site d'interaction avec β_3 , iii) de montrer que le résidu Tyr⁷⁴⁷ de la partie cytoplasmique de β_3 est important pour l'interaction avec le domaine élongé de la taline, et iv) de souligner l'importance physiologique de cette interaction en montrant par la technique du FRET qu'elle a effectivement lieu au sein des cellules.

TABLE DES MATIERES

Table des matières.....	1
Table des illustrations.....	5
Abbréviations.....	7
Liste des publications et communications.....	9
INTRODUCTION.....	11
Chapitre I □ Généralités	13
A. L'adhérence cellulaire.....	13
B. Les récepteurs d'adhésion.....	15
C. Les intégrines	17
C.1. Diversité des intégrines	17
C.2. Structure des sous-unités □	19
C.2.1. Généralités.....	19
C.2.2. Le domaine de l'hélice □	20
C.2.3. Le domaine I	20
C.2.4. Les domaines juxtamembranaires tight, calf-1 et calf 2.....	21
C.2.5. La partie cytoplasmique.....	21
C.3. Structure des sous-unités □	21
C.3.1. Généralités.....	21
C.3.2. Le domaine PSI.....	23
C.3.3. Le domaine hybride et le domaine I-like	23
C.3.4. Les domaines I-EGF	24
C.3.5. La partie cytoplasmique.....	24
C.4. Relation structure – fonction des intégrines	25
C.4.1. Fonction des intégrines	25
C.4.1.1. Signalisation inside-out et activation.....	25
C.4.1.2. Signalisation outside-in.....	26
C.4.2. Structure tertiaire et quaternaire des intégrines	27
C.4.2.1. Les domaines extracellulaires.....	29
C.4.2.2. Les parties cytoplasmiques	31
C.4.3. Relation structure – fonction, un modèle	32
Chapitre II □ L'intégrine □ _{IIb} □ ₃	33
A. Rôle physiologique de l'intégrine □ _{IIb} □ ₃ à la surface plaquettaire	33
B. Structure de l'intégrine □ _{IIb} □ ₃	35
B.1. La sous-unité □ _{IIb}	35
B.2. La sous-unité □ ₃	37
B.2.1. Les ponts disulfure intramoléculaires au niveau de □ ₃	38
B.2.2. Biosynthèse et hétérodimérisation des deux sous-unités.....	39
C. Spécificité de reconnaissance	40
C.1. Le fibrinogène (fg)	41
D. Signalisation à travers l'intégrine □ _{IIb} □ ₃	42
D.1. La signalisation outside-in	43
D.2. La signalisation inside-out	43

Chapitre III	La connexion des intégrines β_3 au cytosquelette d'actine.....	47
A.	Les adhérences focales (AF).....	47
B.	Le cytosquelette d'actine - les filaments d'actine et leur dynamique	49
C.	Protéines impliquées dans la dynamique du cytosquelette d'actine	51
	C.1. La taline	52
	C.2. L' β -actinine	53
	C.3. La vinculine	54
	C.4. La filamine.....	55
D.	La signalisation des intégrines vers le cytosquelette d'actine	55
	D.1. La FAK	56
	D.2. L'ILK (integrin linked kinase).....	57
Chapitre IV	La taline.....	61
A.	Étude physiologique de la taline.....	61
B.	Structure de la taline	63
	B.1. Le domaine globulaire de la taline.....	63
	B.1.1. Le domaine FERM.....	63
	B.2. Le domaine élongé de la taline	65
C.	Rôle physiologique de la taline au niveau des adhérences focales	65
	C.1. L'interaction de la taline avec la PIPK I β	66
	C.2. L'interaction de la taline avec l'actine	66
	C.3. L'interaction de la taline avec la vinculine.....	68
	C.4. L'interaction de la taline avec les intégrines.....	69
	C.4.1. Le domaine globulaire de la taline active les intégrines.....	69
	C.4.1.1. Le mécanisme d'activation	70
	C.4.1.2. Régulation de l'activation	71
	C.4.1.2.1. La PIPKI β et le PIP $_2$	71
	C.4.1.2.2. La calpaïne	71
	C.4.1.2.3. La phosphorylation	72
	C.4.1.2.4. Autres protéines	73
	C.4.2. Interaction du domaine élongé de la taline avec les intégrines.....	73
	OBJECTIFS.....	75
	RESULTATS	79
Chapitre I	Étude de l'interaction de la taline avec la partie cytoplasmique de la sous-unité β_3 des intégrines.....	81
A.	Étude <i>in vitro</i> de l'interaction du domaine élongé de la taline avec β_3	83
	A.1. Purification de la taline humaine entière et de son domaine élongé à partir de plaquettes sanguines.....	83
	A.2. Production et purification de la partie cytoplasmique recombinante de β_3 fusionnée à GST (GST- β_3).....	85
	A.3. Étude <i>in vitro</i> de l'interaction de la taline et de son domaine élongé avec la partie cytoplasmique recombinante GST- β_3	85
B.	Étude de la séquence protéique de la taline par une approche bioinformatique.....	87
	B.1. Recherche de domaines fonctionnels au niveau de la taline humaine.....	87
	B.2. Étude de l'homologie de séquence entre 7 molécules de taline de 5 espèces différentes au niveau des 558 résidus C-terminaux	89
C.	Conclusion et discussion.....	93

Chapitre II	Identification et délimitation d'un site d'interaction avec α_3 au niveau du domaine élongé de la taline	97
A.	Clonage, dans différents vecteurs, de fragments recombinants chevauchant la totalité de la séquence de la taline humaine	97
B.	Optimisation de la transfection transitoire des différents fragments dans les cellules CHO	99
C.	Article : A Fluorescence Cell Biology Approach to Map the Second Integrin-binding Site of Talin to a 130-Amino Acid Sequence within the Rod Domain	102
D.	Détermination de la séquence minimale du domaine élongé de la taline, pouvant interagir avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	113
E.	Conclusion et discussion	114
Chapitre III	Étude fonctionnelle de l'interaction du domaine élongé de la taline avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	117
A.	Étude d'un peptide synthétique minimal d'interaction avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	117
A.1.	Analyse des homologues de séquence du fragment J4 de la taline de différentes espèces	117
A.2.	Étude de l'internalisation des peptides synthétiques dans les cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$	121
A.3.	Étude de l'effet fonctionnel du peptide taline sur l'adhérence des cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$ sur fibrinogène	121
A.4.	Étude de la localisation subcellulaire des peptides dans les cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$	123
A.5.	Conclusion	125
B.	Étude de lignées stables inductibles surexprimant les fragments taline A et J	125
B.1.	Transfection stable des fragments de taline A et J dans les cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$ à l'aide du système inductible T-Rex	127
B.2.	Étude de l'induction des fragments de taline A et J en fonction du temps et de la concentration de tétracycline	129
B.3.	Étude immunochimique de l'expression des fragments de taline A et J en conditions non-induites et induites	131
B.4.	Étude de l'expression de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ à la surface des lignées stables A, J et C	131
B.5.	Étude de la localisation subcellulaire des fragments de taline A et J dans les lignées stables établies	133
B.6.	Étude de l'effet produit par les fragments de taline A et J sur l'adhérence et l'étalement des cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$ sur fibrinogène	135
C.	Conclusion et discussion	135
CONCLUSION ET DISCUSSION FINALE		137
MATERIELS ET METHODES		143
A.	Méthodes de biologie cellulaire	145
A.1.	Culture des cellules CHO	145
A.2.	Détachement et numération des cellules CHO	145
A.3.	Congélation des cellules CHO	145
A.4.	Transfection transitoire de cellules CHO	145
A.5.	Adhérence des cellules sur fibrinogène	146
A.6.	Immunofluorescence intracellulaire indirecte et directe	146
A.7.	Observation au microscope à fluorescence	147
B.	Méthodes de biologie moléculaire	147
B.1.	Amplification d'ADN par PCR	147
B.2.	Extraction d'ARNm à partir de cellules HEL	148
B.3.	RT-PCR/Amplification <i>in vitro</i> d'ADNc à partir de ARNm	148
B.4.	Sous-clonage d'un ADNc dans un vecteur plasmidique	149
B.4.1.	Restriction enzymatique	149
B.4.2.	Électrophorèse en gel d'agarose	150
B.4.3.	Élution des fragments d'ADN du gel d'agarose et purification sur membrane au gel de silicate	150

B.4.4.	Déphosphorylation du vecteur linéarisé et purifié.....	150
B.4.5.	Ligation d'un fragment d'ADN dans le vecteur plasmidique.....	151
B.4.6.	Souches bactériennes utilisées.....	151
B.4.7.	Préparation de bactéries compétentes et transformation par un plasmide.....	151
B.4.8.	PCR sur colonies bactériennes	152
B.4.9.	Préparation de grandes quantités d'ADN plasmidique (Maxiprep).....	152
B.4.10.	Séquençage automatique	153
C.	Méthodes de biochimie.....	153
C.1.	Lyse des plaquettes sanguines	153
C.2.	Purification de la taline entière et de son domaine élongé à partir de lysat plaquettaire	154
C.3.	Purification des protéines de fusion avec GST à partir de lysat bactérien.....	154
C.4.	ELISA (enzyme linked immunsorbant assay).....	155
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	157

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

- Figure 1: Interactions homotypiques ou hétérotypiques réalisées par les différents types de récepteurs d'adhésion
- Figure 2: Associations observées pour les différentes sous-unités α et β des intégrines
- Figure 3: Structure des sous-unités α des intégrines
- Figure 4: Structure des sous-unités β des intégrines
- Figure 5: Structure repliée et étendue de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$
- Figure 6: Structure des parties cytoplasmiques des intégrines
- Figure 7: Structure de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$
- Figure 8: Structure de la partie cytoplasmique de α_{IIb}
- Figure 9: Représentation schématique du fibrinogène
- Figure 10: Représentation schématique des cascades de signalisations initiées par les intégrines au niveau des adhérences focales (AF)
- Figure 11: Structure de l' α -actinine
- Figure 12: Structure de la filamine
- Figure 13: Représentation schématique de la taline
- Figure 14: Sites d'interactions situés au niveau du domaine élongé de la taline
- Figure 15: Purification de la Taline humaine entière et de son domaine élongé à partir de plaquettes sanguines
- Figure 16: Purification de GST et GST- α_3
- Figure 17: Étude *in vitro* de l'interaction de la taline et de son domaine élongé avec la partie cytoplasmique recombinante GST- α_3
- Figure 18: Recherche de domaines fonctionnels au niveau de la taline humaine
- Figure 19: Étude de l'homologie de séquence entre 7 molécules de taline de 5 espèces différentes au niveau des 558 résidus C-terminaux
- Figure 20: Quatre exemples d'optimisation de transfections transitoires dans les cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$ -GFP
- Figure 21: Détermination de la séquence minimale du domaine élongé de la taline, pouvant interagir avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$
- Figure 22: Analyse des homologies de séquence du fragment J4 de la taline de différentes espèces
- Figure 23: Étude de l'internalisation des peptides synthétiques taline et contrôle dans les cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$

- Figure 24: Étude de l'effet fonctionnel du peptide taline sur l'adhérence des cellules CHO $\alpha_{1b}\beta_3$ sur fibrinogène
- Figure 25: Étude de la localisation subcellulaire des peptides taline et contrôle dans les cellules CHO $\alpha_{1b}\beta_3$
- Figure 26: Transfection stable des fragments de taline A et J dans les cellules CHO $\alpha_{1b}\beta_3$ à l'aide du système inductible T-Rex
- Figure 27: Étude de l'induction des fragments de taline A et J en fonction du temps et de la concentration de tétracycline
- Figure 28: Étude immunochimique de l'expression des fragments de taline A et J en conditions non-induites et induites
- Figure 29: Étude de l'expression de l'intégrine $\alpha_{1b}\beta_3$ à la surface des lignées stables A, J et C
- Figure 30: Étude de la localisation subcellulaire des fragments de taline A et J dans les lignées stables établies
- Figure 31: Étude de l'effet produit par les fragments de taline A et J sur l'adhérence et l'étalement des cellules CHO $\alpha_{1b}\beta_3$ sur fibrinogène

Tableaux

- Tableau 1: Etudes structurales réalisées récemment sur les intégrines
- Tableau 2: Protéines interagissant directement avec la partie cytoplasmique des intégrines
- Tableau 3: Pourcentage d'identité de différentes molécules de taline avec la taline1 humaine
- Tableau 4: Recherche de régions conservées au niveau des 558 résidus C-terminaux de la taline
- Tableau 5: Constructions de fragments de taline réalisées dans le cadre de cette étude
- Tableau 6: Optimisation de la transfection transitoire pour les différentes constructions de taline
- Tableau 7: Analyse de l'homologie de séquence entre la taline1 humaine et la taline de *C. elegans* et de la drosophile au niveau du fragment J4

ABREVIATIONS

aa	acides aminés
AF	adhérences focales
BET	bromure d'éthidium
CFP	cyan fluorescent protein
CHO	Chinese hamster ovary
CIB	calcium- and integrin-binding protein
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme linked immunsorbant assay
Erk1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
FAK	focal adhesion kinase
FERM	band4.1, ezrin, radixin, moesin
fg	fibrinogène
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GEF	guanidine nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
GST	glutathion S-transférase
ICAP-1	integrin cytoplasmic domain-associated protein-1
IgCAM	immunoglobulin superfamily of cell adhesion molecules
ILK	integrin linked kinase
LIBS	ligand induced binding site
LIMBS	ligand-associated metal binding site
MEC	matrice extracellulaire
MEKK1	mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase 1
MIDAS	metal ion-dependant adhesion site
PAK	p21-activated kinase
PCR	polymerase chain reaction
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PH	pleckstrin homology
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
PIP ₂	phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PIPK	phosphatidylinositol phosphate kinase
PKB	protein kinase B
PKC	protein kinase C
PKN	protein kinase N
PTB	phosphotyrosine binding
RMN	résonance magnétique nucléaire
SPR	surface plasmon resonance (résonance plasmonique de surface)
TMB	tétraméthyl benzidine
TRITC	tetramethylrhodamine
VASP	vasodilator-stimulated phosphoprotein
VLA	very late antigen
vWF	von Willebrand factor, facteur von Willebrand
WASp	Wiskott-Aldrich Syndrome protein
YFP	yellow fluorescent protein

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

A. Publication

Tremuth, L., Kreis, S., Melchior, C., Hoebeke, J., Ronde, P., Plançon, S., Takeda, K. & Kieffer, N. (2004). A fluorescence cell biology approach to map the second integrin-binding site of talin to a 130-amino acid sequence within the rod domain. *J Biol Chem* 279, 22258-22266.

B. Communications orales

S. Kreis, C. Melchior, L. Tremuth, E. Schaffner-Reckinger & N. Kieffer

Interacting sites within Talin and the integrin α_3 cytoplasmic tail.

XIX^{ème} congrès de «The International Society on Thrombosis and Haemostasis», 12 au 18 juillet 2003, Birmingham, UK.

L. Tremuth, S. Kreis, C. Melchior, J. Hoebeke, P. Rondé, S. Plançon & N. Kieffer

The FRET technology applied to the identification of the second integrin-binding site on talin

Meeting of Research Training Network on Real-Time Thrombosis, 2 au 4 octobre 2003, Dublin, Ireland.

L. Tremuth, S. Kreis, C. Melchior, J. Hoebeke, P. Rondé, S. Plançon & N. Kieffer

A fluorescence cell biology approach to map the second integrin-binding site of talin to a 130-amino acid sequence within the rod domain.

JOURNEE DES BOURSIER(E)S du Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche du Luxembourg, "SCIENCE FESTIVAL 2003", Université du Luxembourg, Luxembourg.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Chapitre I □ Généralités

A. L'adhérence cellulaire

La plupart des cellules d'un organisme multicellulaire sont en contact avec la surface d'autres cellules ou avec la matrice extracellulaire (MEC), un réseau complexe de macromolécules structurales, sécrétées par des cellules. Ainsi les cellules épithéliales interagissent entre elles et avec la membrane basale sous-jacente et les fibroblastes sont en contact avec le tissu conjonctif qui les entoure. Pour que ces contacts se fassent, trois groupes de molécules sont indispensables: i) les récepteurs membranaires d'adhésion, ii) les ligands de ces récepteurs qui peuvent être des molécules de la MEC ou des contre-récepteurs membranaires d'une autre cellule, et iii) les protéines cytoplasmiques des plaques d'adhésion (Gumbiner, 1996). Ces dernières ont deux fonctions essentielles. D'un côté elles établissent un lien structural entre les récepteurs d'adhésion et le cytosquelette d'actine de la cellule et d'un autre côté elles permettent la transduction de signaux en provenance du milieu extracellulaire, via les récepteurs d'adhésion, vers l'intérieur de la cellule (Aplin et al., 1998).

L'adhérence cellulaire assure l'intégrité des tissus et des organes et intervient dans un grand nombre de mécanismes comme la cicatrisation, l'hémostase, l'embryogenèse, les phénomènes inflammatoires ainsi que la prolifération et la mort cellulaire. Un dysfonctionnement de l'adhérence cellulaire se traduit donc souvent par des pathologies assez sévères comme l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral, le cancer ou l'athérosclérose (Rosales et al., 1995; Schwartz et al., 1995; Wehrle-Haller & Imhof, 2003).

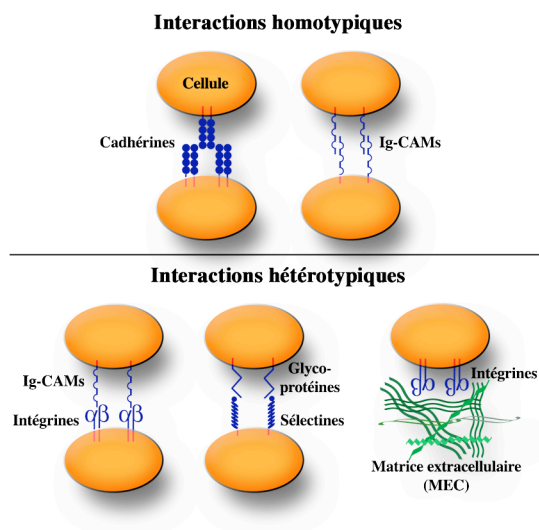


Figure 1: Interactions homotypiques ou hétérotypiques réalisées par les différents types de récepteurs d'adhésion

B. Les récepteurs d'adhésion

Lors de l'adhérence entre cellules, deux types d'interactions peuvent être observés □ des interactions homotypiques (entre récepteurs du même type), et des interactions hétérotypiques (entre récepteurs de type différent). Les interactions homotypiques sont réalisées par les cadhérines et par certains membres de la superfamille des immunoglobulines Ig-CAMs (immunoglobulin superfamily of cell adhesion molecules) alors que les interactions hétérotypiques sont observées entre intégrines et Ig-CAMs ou entre sélectines et glycoprotéines (Figure 1). Lors de l'interaction hétérotypique, le récepteur d'une cellule interagit avec le contre-récepteur d'une autre cellule. Or dans certains cas, comme lors de l'interaction entre lymphocytes T et cellules présentatrices d'antigène, les deux cellules peuvent présenter aussi bien le récepteur que le contre-récepteur et contribuer à part égale à l'interaction (Springer, 1990).

Lors de l'adhérence de cellules à différents types de MECs comme les lames basales ou des matrices minéralisées, les récepteurs d'adhésion impliqués sont presque exclusivement des membres de la famille des intégrines. Les principaux ligands reconnus par les intégrines dans ces matrices sont les collagènes, les laminines et la fibronectine. D'autres ligands sont des protéines du plasma sanguin comme le fibrinogène, le facteur von Willebrand (vWF), la vitronectine et la thrombospondine qui, au niveau des vaisseaux sanguins, peuvent être incorporés dans la MEC adjacente (Humphries, 1990; Haas & Plow, 1994). Les MEC sont assemblées à partir des différents composants, sécrétées par des cellules, en complexes hautement organisés de molécules liées de manière covalente et non-covalente et l'adhérence d'une cellule à la MEC est en général le résultat d'un grand nombre d'interactions de différentes intégrines avec leurs ligands respectifs.

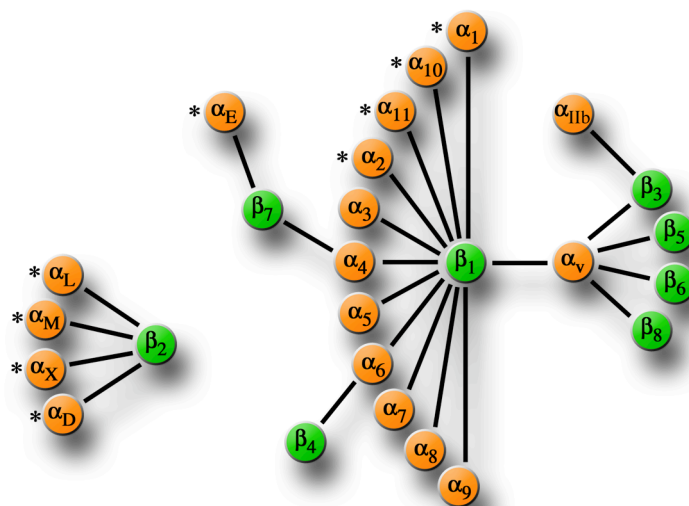


Figure 2: Associations observées pour les différentes sous-unités α et β des intégrines

De nos jours, 19 sous-unités α (orange) et 8 sous-unités β (vert) ont été identifiées qui s'associent de manière non-covalente pour former au moins 25 intégrines hétérodimériques $\alpha\beta$ différentes. Les sous-unités α marquées d'un astérisque (*) contiennent un domaine I (voir paragraphe C.2.1.). Figure modifiée d'après Shimaoka et al. (2002).

C. Les intégrines

Les intégrines constituent la plus grande famille des récepteurs d'adhésion. Leur expression est très étendue puisqu'on les retrouve à la surface de toutes les cellules eucaryotes (Hynes, 1992) comme par exemple chez les mammifères ou encore chez des organismes invertébrés comme la drosophile (Bogaert et al., 1987) ou le nématode *Caenorhabditis elegans* (Gettner et al., 1995). Contrairement aux autres récepteurs, les intégrines sont composées de deux sous-unités transmembranaires différentes α et β (Figure 1). Elles participent de manière hétérotypique aux interactions cellule-MEC et cellule-cellule. Un exemple-type sont les plaquettes sanguines, dont les intégrines assurent l'adhérence à la matrice du sous-endothélium ainsi que l'agrégation des plaquettes entre-elles. Les intégrines intègrent la MEC au cytosquelette d'actine de la cellule, d'où leur nom d'intégrines (Hynes, 1987) et leur interaction avec les protéines de la MEC active des voies de signalisation intracellulaires.

C.1. Diversité des intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques, composées d'une chaîne α et d'une chaîne β , liées de manière non-covalente. Dans le génome humain, 27 gènes ont été identifiés qui codent pour 19 sous-unités α et 8 sous-unités β différentes. De plus, la découverte de différents variants d'épissage pour certaines de ces sous-unités contribue d'avantage à la diversité des intégrines. Les sous-unités α et β s'associent entre-elles pour former au moins 25 hétérodimères $\alpha\beta$ différents (Figure 2) qui se distinguent par leurs ligands bien spécifiques, les protéines cytoplasmiques avec lesquelles elles interagissent et les voies de signalisation intracellulaires qu'elles activent (Humphries, 2000; Shimaoka et al., 2002; Fullard, 2004).

INTRODUCTION

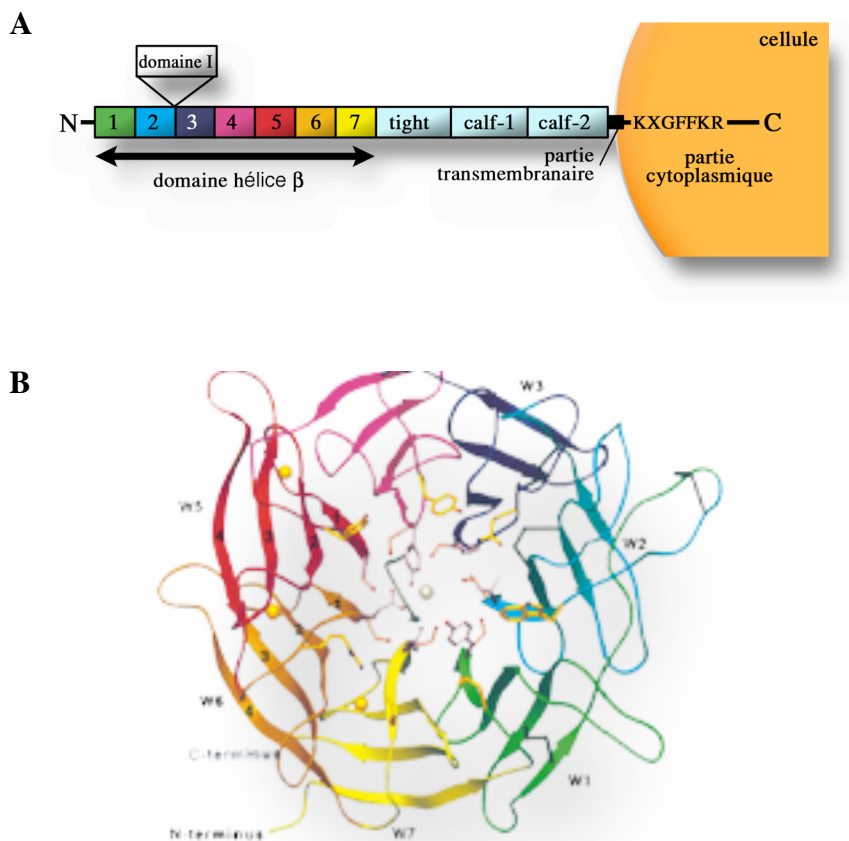


Figure 3: Structure des sous-unités α des intégrines

(A) Représentation schématique de la structure des sous-unités α des intégrines. Du côté extracellulaire elles comprennent 7 segments répétitifs (1 à 7) qui s'assemblent en une structure appelée «hélice α » ainsi que 3 domaines «tight», «calf-1» et «calf-2». De plus une partie des sous-unités α contient un domaine I entre le deuxième et troisième segment répétitif N-terminal. Au niveau cytoplasmique les sous-unités α contiennent une séquence juxtamembranaire «KXGFFKR» conservée. (B) Modèle de la structure en hélice α adoptée par les 7 segments répétitifs N-terminaux (W1 à W7). Figure modifiée d'après Springer (1997).

C.2. Structure des sous-unités α

C.2.1. Généralités

Les sous-unités α des intégrines comportent entre 940 et 1140 acides aminés ce qui correspond à des masses moléculaires entre 120 et 180 kDa. Elles comportent toutes une large partie extracellulaire N-terminale, un domaine transmembranaire et une courte partie cytoplasmique C-terminale. En fonction de leur structure, les sous-unités α peuvent être réparties en deux groupes. Le premier groupe comprend les sous-unités α_3 , α_4 , α_5 , α_6 , α_7 , α_8 , α_9 , α_{IIb} et α_v qui subissent un clivage post-traductionnel lors de leur maturation. Ce clivage génère une chaîne lourde (~125 kDa) entièrement extracellulaire et une chaîne légère (~25 kDa) qui contient le domaine transmembranaire et la partie cytoplasmique. Les deux chaînes sont reliées par un pont disulfure unique. La sous-unité α_4 constitue une exception dans ce groupe car son clivage génère deux chaînes de 70 et 80 kDa respectivement (Takada et al., 1989). Le deuxième groupe comprend les sous-unités α_1 , α_2 , α_{10} , α_{11} , α_D , α_E , α_L , α_M et α_X . Ces sous-unités ne subissent pas de clivage post-traductionnel, mais comportent un domaine supplémentaire dans la partie extracellulaire, appelé domaine I (I pour insertion) (Liddington & Bankston, 1998) ou encore domaine A (A pour son homologie avec le domaine A du vWF) (Figures 2 et 3A) (Colombatti et al., 1993). La sous-unité α_E , qui subit le clivage post-traductionnel du premier groupe mais qui comporte le domaine I du deuxième groupe des sous-unités α , constitue une exception et est classée dans le deuxième groupe à cause de sa chaîne extracellulaire très courte (158 résidus), qui ne ressemble guère aux sous-unités α du premier groupe (Shaw et al., 1994). L'hétérogénéité structurale et fonctionnelle des sous-unités α est renforcée par l'existence de différents variants d'épissage aussi bien au niveau du domaine extracellulaire (α_6 , α_7 et α_{IIb}) qu'au niveau des parties cytoplasmiques (α_3 , α_6 et α_7) (de Melker & Sonnenberg, 1999).

C.2.2. Le domaine de l'hélice α

La partie extracellulaire N-terminale des sous-unités α contient 7 segments répétitifs de 60 acides aminés (aa) environ (Figure 3A α 1 à 7) qui ont une faible homologie de séquence entre eux. L'homologie de séquence de ces segments avec la sous-unité α des protéines G a permis d'établir un modèle structural tridimensionnel. Dans ce modèle les 7 segments adoptent chacun une structure en feuillet β et s'assemblent en une hélice appelée « α propeller β » ou «hélice $\alpha\beta$ » (Figure 3B) (Huang & Springer, 1997; Springer, 1997). Dans un premier temps, le modèle de l'hélice α a été soutenu par l'identification au niveau des feuillets β 4 à 7 (feuillets 5 à 7 pour les sous-unités α qui possèdent le domaine I) de motifs capables de fixer du calcium bivalent (Ca^{2+}), ressemblant à des structures en coude β , souvent trouvées à la jonction de deux feuillets β (Springer et al., 2000). De plus, des études de mutagenèse ont montré que les résidus importants pour l'interaction avec le ligand sont regroupés à la surface de l'hélice α (Kamata et al., 2001). Dans un deuxième temps, le modèle de l'hélice α a été confirmé grâce à la détermination de la structure cristalline de tout le domaine extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Xiong et al., 2001), montrant que chaque pale de l'hélice α est composée de quatre feuillets β anti-parallèles.

C.2.3. Le domaine I

Le domaine I (~200 aa) des sous-unités α du deuxième groupe est inséré entre le deuxième et troisième feuillet β de l'hélice α (Figure 3A) (Huang & Springer, 1997). Ce domaine constitue le principal site d'interaction de l'intégrine avec son ligand (Diamond et al., 1993; Michishita et al., 1993) et la structure cristalline de ce domaine a été résolue par résonance magnétique nucléaire pour de nombreuses intégrines (Lee et al., 1995; Qu & Leahy, 1995; Emsley et al., 1997; Li et al., 1998; Nolte et al., 1999; Legge et al., 2000; Xiong et al., 2000). Le domaine I adopte une structure dite de «Rossmann β » qui consiste en un feuillet β central, entouré de nombreuses hélices α . À la surface de la structure de Rossmann, le domaine I contient une séquence

DXSXS, conservée à travers tous les domaines I des intégrines. Cette séquence, qui constitue un site de fixation pour des ions métalliques, est appelé MIDAS (metal ion-dependent adhesion site) et est capable d'interagir directement avec des résidus chargés négativement du ligand (Tozer et al., 1996; Tuckwell & Humphries, 1997).

C.2.4. Les domaines juxtamembranaires tight, calf-1 et calf 2

Le reste de la séquence extracellulaire des sous-unités α , C-terminale à la séquence de l'hélice α , a été prédite d'adopter une structure en sandwich α (Lu et al., 1998). La structure cristalline de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a révélé la présence dans cette région de trois domaines en sandwich α , appelés tight, calf-1 et calf-2 (Xiong et al., 2001) (Figure 3A).

C.2.5. La partie cytoplasmique

La partie cytoplasmique des sous-unités α est assez courte (20 à 50 aa) et comporte une séquence juxtamembranaire KXGFFKR très conservée. Cette séquence est nécessaire pour l'hétérodimérisation des intégrines (De Melker et al., 1997) et pour la connexion des intégrines au cytosquelette d'actine (Hynes, 2002; Brakebusch & Fassler, 2003). Malgré sa petite taille, la partie cytoplasmique joue un rôle important dans la transduction de signaux et est nécessaire à l'expression membranaire des intégrines (Briesewitz et al., 1995; De Melker et al., 1997; Hynes, 2002).

C.3. Structure des sous-unités α

C.3.1. Généralités

À l'exception de α_4 qui compte 1820 acides aminés, les sous-unités α des intégrines sont composées de 730 à 800 acides aminés et ont des masses moléculaires variant entre 90 et 110 kDa. Les trois premières sous-unités découvertes, α_1 , α_2 et α_3 , ont donné lieu à trois sous-groupes d'intégrines : i) le sous-groupe VLA (very late antigen) nommé d'après l'expression tardive à la surface de lymphocytes T après stimulation antigénique) composé par les intégrines α_1 (Hemler et al., 1987), ii) le sous-groupe des intégrines leucocytaires qui comporte les intégrines α_2 (Kishimoto et al., 1987) et iii) le sous-groupe des cytoadhésines correspondant aux intégrines α_3 (Ginsberg et al., 1988). Le sous-groupe des intégrines α_1 regroupe les récepteurs pour les collagènes ($\alpha_1\alpha_1$, $\alpha_2\alpha_1$ et $\alpha_9\alpha_1$), les laminines de la membrane basale sous-épithéliale ($\alpha_3\alpha_1$, $\alpha_6\alpha_1$ et $\alpha_7\alpha_1$) et la fibronectine ($\alpha_5\alpha_1$ et $\alpha_8\alpha_1$) (Plow et al., 2000). Les intégrines leucocytaires du sous-groupe α_2 ($\alpha_D\alpha_2$, $\alpha_L\alpha_2$, $\alpha_M\alpha_2$ et $\alpha_X\alpha_2$) jouent un rôle important dans le processus inflammatoire en assurant l'extravasation des leucocytes vers les sites infectieux (Carlos & Harlan, 1994). Le sous-groupe des cytoadhésines comporte uniquement deux intégrines : l'intégrine $\alpha_{IIb}\alpha_3$, le récepteur du fibrinogène, et l'intégrine $\alpha_v\alpha_3$, le récepteur de la vitronectine. Alors que l'intégrine $\alpha_{IIb}\alpha_3$ est uniquement exprimée à la surface de cellules de la lignée

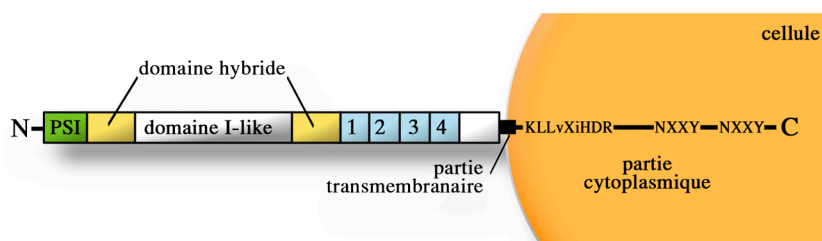


Figure 4: Structure des sous-unités α des intégrines

Représentation schématique de la structure des sous-unités α des intégrines. Du côté N-terminal elles comportent le domaine PSI, le domaine hybride dans lequel s'insère le domaine I-like, ressemblant au domaine I des sous-unités β et 4 domaines I-EGF. Au niveau cytoplasmique elles possèdent trois séquences conservées dans toutes les sous-unités α .

mégacaryocytaire, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est retrouvée sur un grand nombre de cellules comme les cellules endothéliales, les cellules des muscles lisses vasculaires, les macrophages, les lymphocytes B et les ostéoclastes (Kieffer & Phillips, 1990; Felding-Habermann & Cheresh, 1993).

C.3.2. Le domaine PSI

Les 50 acides aminés N-terminaux des sous-unités α montrent une homologie de séquence avec des protéines membranaires comme les plexines et les sémaphorines. Cette région est appelée domaine PSI (pour plexins, semaphorins et integrins) (Bork et al., 1999; Shimaoka et al., 2002) (Figure 4). Elle contient 7 cystéines, pouvant s'engager potentiellement dans des ponts disulfures intramoléculaires. Même s'il existe des études contradictoires quant aux ponts disulfure qui s'établissent réellement *in vivo*, il est clair que ces liaisons intramoléculaires sont importantes pour la ou les conformations adoptées par les intégrines (Calvete et al., 1991; Bork et al., 1999; Xiong et al., 2004).

C.3.3. Le domaine hybride et le domaine I-like

Les sous-unités α contiennent un domaine hybride dans lequel s'insère un domaine de 240 acides aminés environ, très conservé au cours de l'évolution, qui couvre approximativement les résidus 100 à 340 (Figure 4). Alors que les deux parties du domaine hybride (aa 50-100 et 350-400 approximativement) s'assemblent dans la structure tertiaire de l'intégrine pour s'organiser en sandwich α (Xiong et al., 2001), le domaine inséré adopte une structure secondaire semblable à celle du domaine I des sous-unités β (Lee et al., 1995; Ponting et al., 2000). C'est pourquoi il est appelé domaine I-like (like = comme). Le domaine I-like contient un motif de séquence (DXSXS) d'interaction avec un ion métallique, semblable au site MIDAS du domaine I des sous-unités β . Ce site MIDAS putatif des sous-unités α est flanqué par deux autres sites de coordination métallique, le site ADMIDAS (adjacent au site MIDAS) et le site LIMBS (ligand-associated metal binding site) (Xiong et al., 2001; Xiong et

INTRODUCTION

al., 2002). Dans la conformation native des intégrines, le domaine I-like de la sous-unité α est en étroit contact avec l'hélice β des sous-unités β (Xiong et al., 2001). Pour les intégrines qui ne possèdent pas de domaine I au niveau de la sous-unité α (Figure 2), le domaine I-like interagit directement avec le ligand alors que pour les intégrines qui possèdent un domaine I, il semble réguler indirectement l'interaction du domaine I avec le ligand.

C.3.4. Les domaines I-EGF

La partie juxtamembranaire extracellulaire des sous-unités α (~ aa 435-600) contient une répétition de 4 domaines riches en cystéines appelés I-EGF (integrin-EGF) à cause de leur homologie avec le domaine du facteur de croissance épidermique (EGF, epidermal growth factor). Ces domaines ont des caractéristiques structurales qui les rendent rigides de manière à pouvoir transmettre des forces et mouvements structuraux d'un côté de la molécule vers l'autre (Takagi et al., 2001; Beglova et al., 2002).

C.3.5. La partie cytoplasmique

Les parties cytoplasmiques des sous-unités α sont assez courtes (15-65 aa) et conservées, à l'exception de celles de α_4 et α_8 , qui sont plus longues et divergentes au niveau de la séquence (Williams et al., 1994). En général, trois motifs conservés sont présents i) une séquence juxtamembranaire KLLvXiHDR où le «Xi» représente un résidu non-conservé, «v» représente un des résidus I, F ou L et «H» représente un des résidus V, I ou M, ii) un premier motif NXXY capable d'adopter une structure en coude β , et iii) un deuxième motif NXXY du côté C-terminal (Reszka et al., 1992). Les deux motifs de séquence consensus NXXY sont impliqués dans de nombreux processus comme l'étalement cellulaire (Ylanne et al., 1995), le recrutement de protéines cytoplasmiques (Hemler, 1998; Schaffner-Reckinger et al., 1998) et l'internalisation des intégrines (Chen et al., 1990). Ils possèdent tous les deux un résidu Y et sont donc potentiellement phosphorylables. Le premier des deux motifs

NXXY comporte souvent un résidu proline en deuxième position, lui permettant d'adopter une structure en coude β (Haas & Plow, 1997; Vinogradova et al., 2004).

L'identification de nombreux variants d'épissage des sous-unités β_1 (β_{1B} , β_{1C} , β_{1C-2} et β_{1D}), β_3 (β_{3B} et β_{3C}), β_4 (β_{4B} , β_{4C} , β_{4D} et β_{4E}) et β_5 (β_{5B}) (de Melker & Sonnenberg, 1999) souligne l'importance du domaine cytoplasmique des sous-unités β des intégrines et révèle l'existence de mécanismes subtils de régulation des fonctions des intégrines.

C.4. Relation structure – fonction des intégrines

C.4.1. Fonction des intégrines

Une première fonction des intégrines consiste à interagir au niveau extracellulaire avec leurs ligands. Lors de cette interaction, les intégrines se regroupent en complexes, augmentant l'avidité pour leurs ligands. Ce phénomène est connu sous le nom de «clustering». La connexion de ces complexes au cytosquelette d'actine, via l'interaction avec des protéines cytoplasmiques, résulte dans la formation de adhérences focales (AF) qui constituent les points d'ancrage de la cellule. Les intégrines peuvent également transmettre des signaux à travers la membrane plasmique et cela de manière bidirectionnelle, c'est à dire de l'extérieur vers l'intérieur (signalisation «outside-in») et de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule (signalisation «inside-out»). Lors de la signalisation inside-out, l'affinité des intégrines pour leur ligand extracellulaire est augmentée dans un laps de temps inférieur à la seconde. Ce phénomène est appelé «activation» de l'intégrine et est propre aux intégrines comparées à d'autres récepteurs membranaires.

C.4.1.1. Signalisation inside-out et activation

Lors de la signalisation inside-out à travers les intégrines, des cascades de signalisations intracellulaires, activées au préalable par d'autres récepteurs (comme

INTRODUCTION

les récepteurs couplés aux protéines G ou les récepteurs à activité tyrosine kinase) peuvent agir sur les parties cytoplasmiques de l'intégrine et induire son activation (Dustin & Springer, 1989; Lollo et al., 1993; Constantin et al., 2000), ce qui résulte dans une augmentation de l'affinité de l'intégrine pour son ligand extracellulaire (Takagi & Springer, 2002). Des études structurales et des études réalisées à l'aide d'anticorps ont montré que l'activation des intégrines correspond à un changement conformationnel, initié au niveau des parties cytoplasmiques et qui se propage à travers les parties transmembranaires jusqu'aux domaines extracellulaires (Liddington & Ginsberg, 2002; Takagi & Springer, 2002; Xiong et al., 2003; Calderwood, 2004a). Ce changement conformationnel induit au niveau extracellulaire l'exposition d'épitopes spécifiques de la forme activée de l'intégrine. À ce jour, un nombre restreint de protéines qui sont capables d'activer les intégrines en interagissant avec leurs parties cytoplasmiques a été identifié : la β_3 -endonexine (Shattil et al., 1995; Eigenthaler et al., 1997; Kashiwagi et al., 1997), la cytohésine-1 (Kolanus et al., 1996; Geiger et al., 2000), la CIB (calcium- and integrin-binding protein) (Tsuboi, 2002) et la taline (Calderwood et al., 1999; Tadokoro et al., 2003). Alors que l'effet activateur de la β_3 -endonexine et la cytohésine-1 semble se limiter aux intégrines β_3 et β_2 respectivement (Eigenthaler et al., 1997; Nagel et al., 1998), la taline interagit avec la partie cytoplasmique d'un grand nombre de sous-unités α (Horwitz et al., 1986; Knezevic et al., 1996; Pfaff et al., 1998; Goldmann, 2000; Xing et al., 2001) et semble ainsi constituer un mécanisme de régulation plus général pour les intégrines (Tadokoro et al., 2003).

C.4.1.2. Signalisation outside-in

La signalisation outside-in est un mécanisme plus classique des récepteurs membranaires qui n'est pas propre aux intégrines. Comme la plupart des ligands des intégrines sont multivalents (ils possèdent plusieurs sites pour interagir avec les intégrines), leur interaction avec la partie extracellulaire des intégrines induit le regroupement des intégrines au niveau de la membrane plasmique en complexes appelés «clusters». Ces complexes peuvent recruter des protéines de signalisation au niveau cytoplasmique et induire des cascades de signalisation intracellulaire. Il est

généralement admis que c'est le clustering des intégrines qui induit la transduction de signaux de l'extérieur vers l'intérieur (Giancotti & Ruoslahti, 1999) mais Hato et al. (1998) ont montré que le clustering en lui-même n'est pas suffisant pour induire une signalisation outside-in complète (Hato et al., 1998). Il est donc évident que la signalisation outside-in nécessite également des changements conformationnels au niveau des intégrines.

C.4.2. Structure tertiaire et quaternaire des intégrines

De nombreuses études structurales, essentiellement sur les parties extracellulaires de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et sur les parties cytoplasmiques de $\alpha_{IIb}\beta_3$, ont permis récemment de mieux comprendre le fonctionnement des intégrines et leur mécanisme d'activation (Tableau 1).

Référence bibliographique	Intégrine étudiée	Domaine étudié	Technique utilisée	Remarque
(Xiong et al., 2001)	$\alpha_v\beta_3$	extracellulaire	Structure cristalline	
(Xiong et al., 2002)	$\alpha_v\beta_3$	extracellulaire	Structure cristalline	Domaine extracellulaire complexé avec RGD
(Beglova et al., 2002)	α_2	domaines IEGF	RMN	
(Adair & Yeager, 2002)	$\alpha_{IIb}\beta_3$	intégrale	Microscopie électronique et cristallographie aux rayons X	Constitution d'un modèle 3D
(Takagi et al., 2002)	$\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_v\beta_3$	extracellulaire	Microscopie électronique	
(Weljie et al., 2002)	$\alpha_{IIb}\beta_3$	cytoplasmique	Spectroscopie RMN 2D	
(Vinogradova et al., 2000)	α_{IIb}	cytoplasmique	Structure RMN	
(Li et al., 2001)	$\alpha_{IIb}\beta_3$	cytoplasmique	RMN	
(Vinogradova et al., 2002)	$\alpha_{IIb}\beta_3$	cytoplasmique	Structure RMN	
(Vinogradova et al., 2004)	$\alpha_{IIb}\beta_3$	cytoplasmique	Spectroscopie RMN	

Tableau 1: Etudes structurales réalisées récemment sur les intégrines

RMN = résonance magnétique nucléaire

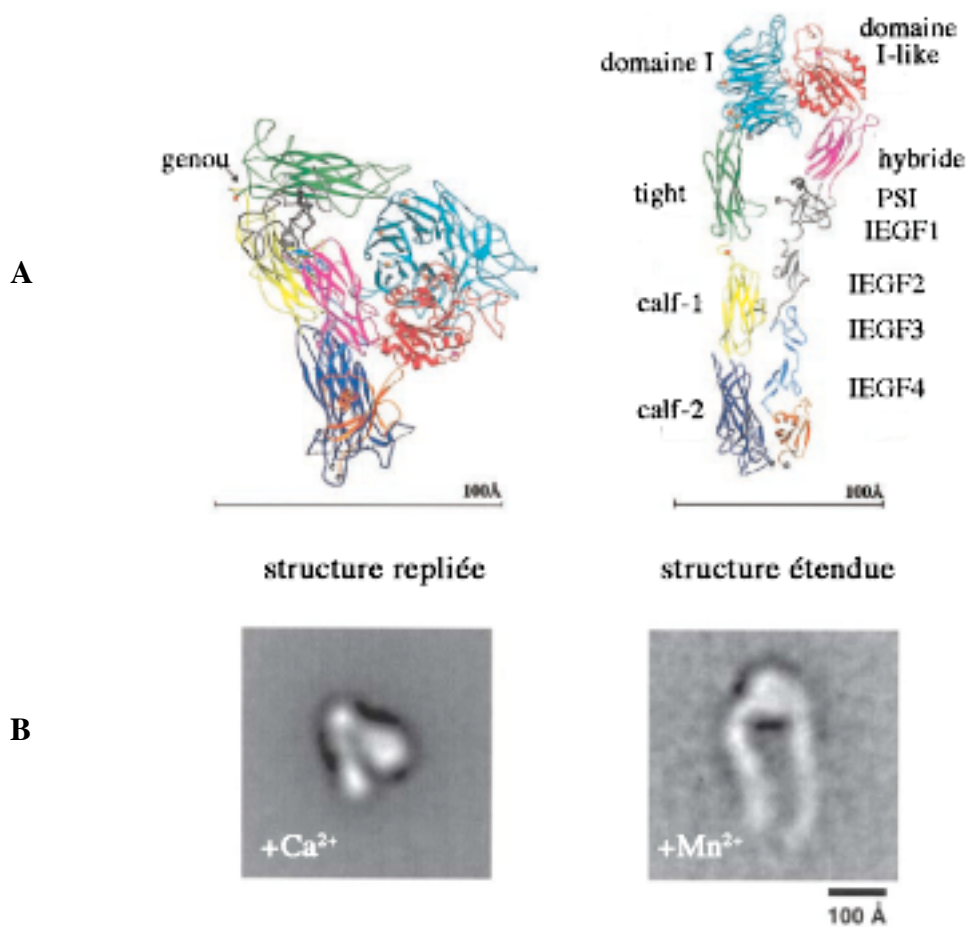


Figure 5: Structure repliée et étendue de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

(**A**) Diagramme en rubans des deux conformations adoptées par la partie extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Figure modifiée d'après Xiong et al. (2003). (**B**) Images prises en microscopie électronique après marquage négatif de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ recombinante en solution. Figure modifiée d'après Takagi et al. (2002).

C.4.2.1. Les domaines extracellulaires

Contre toute attente, la détermination de la structure cristalline des parties extracellulaires de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a révélé une forme repliée en V plutôt qu'une structure bien étendue (Figure 5A) (Xiong et al., 2001). La partie N-terminale des deux sous-unités s'assemble en une «tête» ovoïde à partir de laquelle émergent les deux «jambes» allant vers la membrane. La forme en V est conférée à la molécule par un repliement de 135 degrés environ au niveau des jambes. Ce repliement forme un «genou» entre les domaines «Ight» et «Ialf-1» de la sous-unité α et au niveau des domaines «IEGF1» et «IEGF2» de la sous-unité β . Dans cette structure en V, le domaine I de la sous-unité α est proche de la membrane et difficilement accessible pour un ligand potentiel. C'est pourquoi cette structure en V semble correspondre à la forme inactive de l'intégrine. Lors de l'activation, l'intégrine adopterait alors une structure plus étendue exposant le domaine I-like à des ligands potentiels. Cette hypothèse est soutenue par des observations en microscopie électronique, montrant que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ peut adopter deux conformations i) une conformation repliée, observée en présence de Ca^{2+} , un cation stabilisant l'intégrine dans sa forme inactive, et ii) une conformation étendue en présence de Mn^{2+} , un cation activateur de l'intégrine (Figure 5B), ou en présence d'un peptide RGD qui mime la présence d'un ligand (Takagi et al., 2002). La structure cristalline de la partie extracellulaire de $\alpha_v\beta_3$ en complexe avec un peptide RGD, mimétique de ligand, a permis de montrer que le ligand interagit avec les deux sous-unités de l'intégrine au niveau de l'hélice α de la sous-unité α et du domaine I-like de la sous-unité β . Cette interaction s'accompagne de changements conformationnels, influençant surtout la structure du domaine I-like de la sous-unité α , mais aussi l'orientation relative des deux sous-unités.

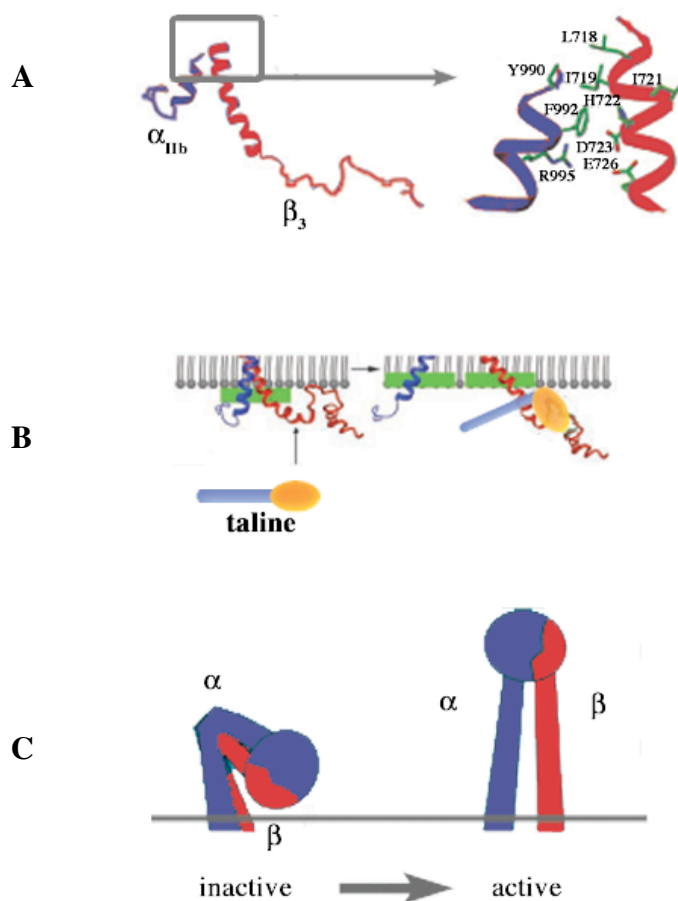


Figure 6: Structure des parties cytoplasmiques des intégrines

(A) Diagramme en rubans montrant la structure des parties cytoplasmiques de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et leur interaction au niveau juxtamembranaire. Figure modifiée d'après Vinogradova et al. (2002). (B) Modèle structural de la séparation spatiale des parties cytoplasmiques de $\alpha_{IIb}\beta_3$ lors de l'activation par la taline. Lors de l'écartement des parties cytoplasmiques, les parties juxtamembranaires sont enfoncées dans la membrane plasmique. Figure modifiée d'après Vinogradova et al. (2004). (C) Représentation schématique des structures adoptées par les intégrines dans leur état inactif et actif. Figure modifiée d'après Takagi & Springer (2002).

C.4.2.2. Les parties cytoplasmiques

Les intégrines sont restreintes dans leur conformation inactive par une interaction entre les parties cytoplasmiques des deux sous-unités (Williams et al., 1994; Hughes et al., 1996; Lu et al., 2001). L'étude de mutations au niveau des parties cytoplasmiques a suggéré que l'interaction des deux sous-unités se fait surtout au niveau de résidus chargés, proches de la membrane (Hughes et al., 1996). Lu et al. (2001) ont remplacé les parties cytoplasmiques de l'intégrine $\alpha_L\beta_2$ par des peptides s'associant fortement, ce qui ne permettait plus aucune activation de l'intégrine (Lu et al., 2001). Récemment la structure des parties cytoplasmiques de $\alpha_{IIb}\beta_3$ a été résolue par RMN montrant de multiples interactions hydrophobes et électrostatiques entre les séquences proches de la membrane des deux sous-unités (Figure 6A) (Vinogradova et al., 2002). Ces interactions ont pu être rompues par des mutations ponctuelles ou par l'interaction de la taline, une protéine qui active les intégrines. De plus Vinogradova et al. (2004) ont montré que lors de leur séparation, les résidus juxtamembranaires des parties cytoplasmiques de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ sont enfoncés dans des micelles mimétiques de la membrane (Figure 6B) (Vinogradova et al., 2004). Ce mouvement pourrait expliquer comment un changement conformationnel peut se propager à travers la membrane vers les domaines extracellulaires. Récemment Kim et al. (2003) ont analysé du FRET (fluorescence resonance energy transfer) entre les sous-unités α_L et β_2 , fusionnés au niveau de leurs parties cytoplasmiques à CFP (cyan fluorescent protein) et YFP (yellow fluorescent protein). Dans l'état inactif de l'intégrine, les deux protéines fluorescentes étaient suffisamment rapprochées pour permettre un transfert d'énergie alors qu'en présence d'agonistes activateurs ou de mutations activatrices le transfert d'énergie était diminué, témoignant d'un écartement des parties cytoplasmiques. Cette étude est la première confirmation dans un modèle *in vivo* de la réalité de l'écartement des parties cytoplasmiques au cours de l'activation de l'intégrine (Kim et al., 2003).

C.4.3. Relation structure – fonction, un modèle

Même si on ne dispose pas encore d'un modèle exhaustif en ce qui concerne la régulation de la fonction des intégrines, toutes les découvertes récentes ont mené à un modèle global cohérent (Figure 6C). L'interaction des parties cytoplasmiques de l'intégrine contraint cette dernière dans un état inactif. Il n'est pas encore connu si l'interaction des parties cytoplasmiques est suffisante pour cette contrainte ou si d'autres protéines inhibitrices de l'activation interviennent à ce niveau. Lorsque l'intégrine est dans sa conformation inactive, les domaines extracellulaires adaptent une structure en V, ce qui ramène le site d'interaction pour un ligand potentiel proche de la membrane. Lors de l'activation de l'intégrine, le détachement d'une protéine inhibitrice ou la fixation d'une protéine activatrice au niveau des domaines cytoplasmiques, induit leur séparation spatiale. Cette séparation induit un changement conformationnel qui se propage à travers la membrane, redressant les domaines extracellulaires. Le site d'interaction avec un ligand potentiel, à l'interface des deux sous-unités, est ainsi éloigné de la membrane et adopte une conformation active. L'interaction d'un ligand extracellulaire peut alors induire un deuxième changement conformationnel de l'intégrine, se propageant à travers la membrane jusqu'aux parties cytoplasmiques et induisant des cascades de signalisation intracellulaire.

Chapitre II □ L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, également connue sous le nom de glycoprotéine GPIIb-IIIa, est le principal récepteur du fibrinogène des plaquettes sanguines (Phillips et al., 1988; Plow & Ginsberg, 1989). Elle est exprimée de façon tissu-spécifique à la surface des cellules de la lignée mégacaryocytaire dont naissent les plaquettes sanguines (Plow et al., 1986; Kieffer et al., 1991). Les plaquettes sanguines, qui sont des particules anucléées discoïdes, issues de mégacaryocytes, expriment un grand nombre de récepteurs $\alpha_{IIb}\beta_3$ à leur surface membranaire (50'000 récepteurs par plaquette environ) et ce nombre double pratiquement après l'activation plaquettaire grâce à l'exposition membranaire d'un pool interne présent dans les membranes internes du système canaliculaire et dans les granules de stockage □ (Wencel-Drake et al., 1986; Quinn et al., 1999).

A. Rôle physiologique de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ à la surface plaquettaire

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est présente à la surface des plaquettes circulantes sous sa forme inactive. En effet, les plaquettes, qui circulent dans le flux sanguin, sont non-thrombogènes et incapables d'interagir avec l'endothélium vasculaire ou avec le fibrinogène plasmatique. En cas d'une exposition du sous-endothélium vasculaire, suite à un traumatisme ou en cas d'une génération locale d'agonistes solubles comme la thrombine ou le thromboxane A_2 (agonistes forts), l'ADP, l'adrénaline ou la sérotonine (agonistes faibles), les plaquettes sont activées, elles peuvent adhérer au sous-endothélium vasculaire et agréger pour former un thrombus. L'adhérence initiale des plaquettes dans ce cas est assurée par différents récepteurs, comme le récepteur GP Ib-IX-V, qui interagit avec le facteur von Willebrand dans des conditions de flux élevé, ou comme l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, qui interagit avec le collagène dans des conditions de faible flux. La signalisation intracellulaire de ces récepteurs peut alors activer l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, augmentant son affinité pour le fibrinogène soluble, principal ligand de $\alpha_{IIb}\beta_3$. Comme le fibrinogène est une molécule dimérique, possédant plusieurs sites d'interaction avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, il interagit avec plusieurs plaquettes voisines et

INTRODUCTION

entraîne ainsi l'agrégation plaquettaire qui conduit à la formation d'un thrombus et résulte dans l'obstruction de la brèche vasculaire (Blockmans et al., 1995; Fullard, 2004).

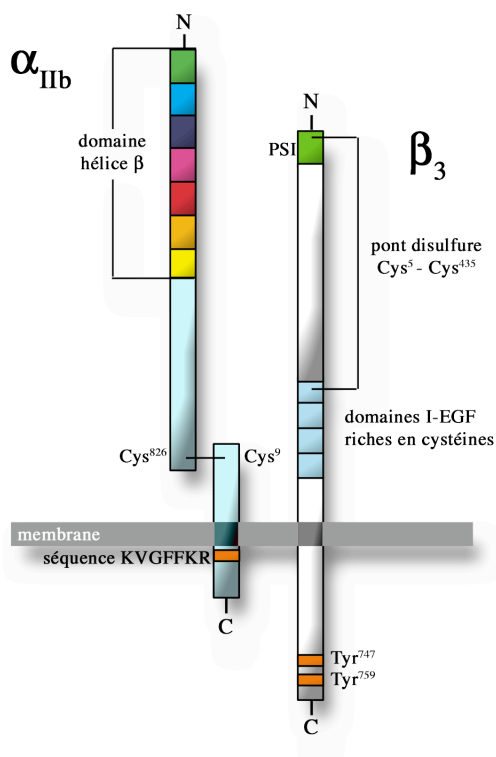


Figure 7: Structure de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

La figure montre les différents domaines de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. La sous-unité α_{IIb} est composée d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde, reliées par un pont disulfure, et contient un domaine N-terminal en hélice β . La sous-unité β_3 contient 4 domaines I-EGF, riches en cystéines, qui semblent impliqués dans l'activation de l'intégrine via le réarrangement de ponts disulfure. Le premier domaine I-EGF est relié au domaine PSI par un pont disulfure qui est rompu lors de l'activation du récepteur. Au niveau cytoplasmique la figure montre la séquence KVGFFKR de la chaîne α_{IIb} et les deux résidus tyrosine des motifs NXXY de la chaîne β_3 , impliqués dans la signalisation outside-in de l'intégrine.

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ joue donc un rôle important dans le mécanisme de régulation de l'hémostase. Des défauts génétiques résultant dans une expression insuffisante de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou dans l'expression d'un récepteur non fonctionnel sont la cause d'une maladie hémorragique grave, connue sous le nom de thrombasthénie de Glanzmann (Nurden & Caen, 1974; Phillips & Agin, 1977). À l'inverse, une agrégation excessive des plaquettes peut mener à l'obstruction de vaisseaux, responsable de l'infarctus du myocarde ou de l'incident vasculaire cérébral.

B. Structure de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

B.1. La sous-unité α_{IIb}

Le gène codant pour la sous-unité α_{IIb} a été délimité à la région q21.1-q21.3 du chromosome 17 (Cong et al., 1988) et couvre une région de 17,2 kb comportant une trentaine d'exons (Heidenreich et al., 1990; Poncz & Newman, 1990). L'ARNm transcrit comporte 3,5 kb avec une séquence leader de 32 nucléotides (Bray et al., 1987; Prandini et al., 1988). La sous-unité α_{IIb} est traduite en une chaîne polypeptidique, puis clivée en deux parties reliées par un pont disulfure (Bray et al., 1986; Rosa & McEver, 1989). En conditions physiologiques, α_{IIb} a une masse moléculaire de 136 kDa alors qu'en conditions réductrices la chaîne lourde (125 kDa) et la chaîne légère (25 kDa) sont séparées (Jennings & Phillips, 1982). Le pont disulfure qui relie les deux chaînes se forme entre deux cystéines, la $^L\text{Cys}^9$ de la chaîne légère transmembranaire et la $^H\text{Cys}^{826}$ de la chaîne lourde extracellulaire (Figure 7) (Calvete & Gonzalez-Rodriguez, 1986). La chaîne lourde de α_{IIb} , qui ne possède pas de domaine I, comporte du côté N-terminal 7 segments répétitifs qui s'assemblent en une hélice α , classique des sous-unités α (Figure 3B) (Springer, 1997). Les 4 derniers de ces segments comportent des motifs capables de fixer du calcium bivalent (Ca^{2+}) et semblent jouer un rôle dans la régulation de l'interaction de l'intégrine avec son ligand (Gulino et al., 1992; Honda et al., 1998; Tozer et al.,

INTRODUCTION

1999). En effet de nombreuses mutations identifiées au niveau de ces domaines conduisent à des phénotypes pathologiques (French & Coller, 1997).

La partie cytoplasmique de α_{IIb} comprend 20 acides aminés et comporte une séquence juxtamembranaire GFFKR très conservée au niveau des différentes sous-unités α des intégrines. Cette séquence semble être impliquée dans le transport vers la membrane de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (voir paragraphe B.2.2. Hétérodimérisation des deux sous-unités) et dans l'interaction avec la partie cytoplasmique de la sous-unité β_3 , qui contraint l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans un état de faible affinité (Hughes et al., 1996; Vallar et al., 1999; Vinogradova et al., 2002). La structure par RMN a montré que la partie cytoplasmique de α_{IIb} semble adopter une conformation «fermée» avec le côté C-terminal acide (il contient 5 résidus d'acide glutamique) qui se replie vers la membrane (Figure 8A). Ce repliement est possible grâce à la présence de deux résidus proline en position 998 et 999. En effet, la mutation de ces deux prolines en alanines, décrite comme activatrice de $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Leisner et al., 1999) résulte dans une conformation «ouverte» non-repliée (Figure 8B) (Vinogradova et al., 2000).

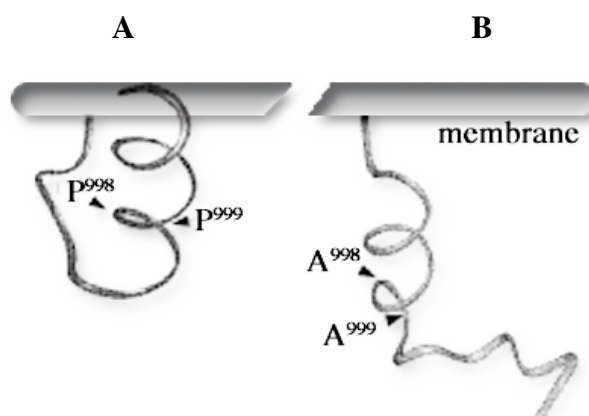


Figure 8: Structure de la partie cytoplasmique de α_{IIb}

Diagramme à rubans de la structure de la partie cytoplasmique de α_{IIb} . (A) Les deux résidus proline (998 et 999) permettent un repliement du C-terminus de la molécule vers la membrane plasmique. (B) La mutation des deux résidus proline en alanine, qui active $\alpha_{IIb}\beta_3$, résulte dans une structure plus ouverte ne permettant plus de repliement vers la membrane. Figure modifiée d'après Vinogradova et al. (2000).

B.2. La sous-unité β_3

Le gène codant pour la sous-unité β_3 a été identifié au niveau de la région q21-22 du chromosome 17 et couvre une région de 63 kb. Le gène comporte 15 exons et il est intéressant à noter que le premier intron est particulièrement long (16,7 kb) (Bray et al., 1988; Rosa et al., 1988; Sosnoski et al., 1988; Lanza et al., 1990). L'ARNm transcrit a une taille de 3,17 kb et est traduit en un polypeptide de 762 acides aminés avec un peptide signal de 26 amino acides du côté N-terminal (Fitzgerald et al., 1987; Rosa et al., 1988). Le poids moléculaire apparent est de 95 kDa dans des conditions physiologiques et de 114 kDa en conditions réductrices. Comme toutes les sous-unités β des intégrines, la partie extracellulaire de β_3 comporte un domaine PSI du côté N-terminal, un domaine hybride dans lequel est inséré le domaine I-like, qui contient 3 sites de coordination métallique (MIDAS putatif, ADMIDAS et LIMBS), ainsi que 4 domaines I-EGF, riches en cystéines, du côté membranaire. Le site putatif de coordination métallique MIDAS ressemble fortement au site MIDAS du domaine I des sous-unités β . L'importance de ce site dans l'interaction de $\alpha_{IIb}\beta_3$ avec son ligand a été soulignée par la découverte de mutations ponctuelles dans l'environnement de ce site qui résultent, pour les patients, dans la thrombasthénie de Glanzmann (Loftus et al., 1990). Récemment la structure cristalline de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en complexe avec un ligand RGD a révélé que les trois sites de coordination métallique de β_3 (MIDAS putatif, ADMIDAS et LIMBS) sont occupés par un cation métallique et que le cation du site MIDAS putatif est en contact direct avec le ligand alors que les deux autres semblent stabiliser l'interaction (Xiong et al., 2002).

La partie cytoplasmique de β_3 comporte 47 acides aminés avec, du côté proche de la membrane, la séquence conservée ⁷¹⁶KLLITIHDR⁷²⁴. Cette séquence semble établir des interactions hydrophobes et électrostatiques avec la séquence GFFKR de la sous-unité α_{IIb} , contraignant l'intégrine dans sa conformation inactive (Vinogradova et al., 2002). En effet, il a été suggéré qu'un pont salin entre les résidus R⁹⁹⁵ de α_{IIb} et D⁷²³ de β_3 stabilise cette interaction puisque la mutation ponctuelle de l'un de ces deux résidus suffisait pour activer l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Hughes et al., 1996; Vallar et al., 1999). La partie cytoplasmique de β_3 contient trois autres motifs conservés parmi les

INTRODUCTION

sous-unités α , appelés cyto-1, cyto-2 et cyto-3 (Reszka et al., 1992). Le motif cyto-1, de séquence $^{723}\text{DRKEFAKFEEE}^{733}$, est proche de la membrane et est impliqué dans le recrutement de la skélémine (Reddy et al., 1998). Les motifs cyto-2 et cyto-3 sont composés de 4 résidus de séquence consensus NXXY ($^{744}\text{NPLY}^{747}$ pour cyto-2 et $^{756}\text{NITY}^{759}$ pour cyto-3) et sont donc potentiellement phosphorylables. Le résidu proline au niveau de cyto-2 permet au motif d'adapter une structure en coude α , ce qui provoque le repliement de la partie C-terminale vers la membrane (Haas & Plow, 1997; Ulmer et al., 2001; Vinogradova et al., 2004) (Figure 6B). Ce motif est également impliqué dans l'interaction avec la taline puisque la partie cytoplasmique mutante $\alpha_3\text{Y}^{747}\text{A}$ n'est plus capable de fixer le domaine globulaire de la taline (Calderwood et al., 1999). De plus les motifs cyto-2 et cyto-3 semblent être impliqués dans le recrutement de nombreuses autres protéines, structurales ou de signalisation, au niveau des parties cytoplasmiques de $\alpha_{\text{Ib}}\alpha_3$ (Liu et al., 2000; Xi et al., 2003).

B.2.1. Les ponts disulfure intramoléculaires au niveau de α_3

La sous-unité α_3 contient au total 56 cystéines, toutes potentiellement capables de former des ponts disulfure intramoléculaires. 31 de ces 56 résidus cystéine sont localisés au niveau des 4 domaines I-EGF, une région particulièrement riche en cystéines. De nombreuses études ont montré une augmentation de l'affinité des intégrines pour leurs ligands respectifs en présence de l'agent réducteur DTT (Zucker & Masiello, 1984; Sun et al., 1992; Davis & Camarillo, 1993). La même observation a également été faite pour l'intégrine $\alpha_{\text{Ib}}\alpha_3$ (Kouns et al., 1994; Peerschke, 1995; Yan & Smith, 2001). Comme l'activation de $\alpha_{\text{Ib}}\alpha_3$ correspond à un changement conformationnel de la molécule, il est imaginable que la rupture ou la réorganisation de ponts disulfure est impliquée dans ce mécanisme. De nos jours, les approches biochimiques disponibles n'ont pas permis la caractérisation de tous les ponts disulfure intramoléculaires pour α_3 (Calvete et al., 1991) mais certaines des cystéines, au niveau des domaines I-EGF, sont sous forme libre c'est-à-dire non impliquées dans des ponts disulfure (Yan & Smith, 2000), constituant ainsi un site rédox. Il a été montré que l'activation de $\alpha_{\text{Ib}}\alpha_3$ implique la modification d'au moins un pont disulfure

intramoléculaire (Yan & Smith, 2000; Yan & Smith, 2001) et que la mutation de diverses cystéines au niveau de β_3 (Cys⁵, Cys⁴³⁵, Cys⁵⁹⁸ et Cys⁵⁶⁰) résulte dans l'expression d'un récepteur spontanément actif (Shattil et al., 1985; Chen et al., 2001; Ruiz et al., 2001; Sun et al., 2002). Tous ces résultats confirment l'importance du remaniement de ponts disulfure intramoléculaires au niveau de β_3 lors de la transition de l'état inactif à l'état actif de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Cette importance a été soulignée d'avantage par la découverte d'une activité isomérase endogène associée aux intégrines contenant la sous-unité β_3 (O'Neill et al., 2000). Cette activité a été associée à quatre motifs CXXC au niveau de la région riche en cystéines de β_3 . La séquence CXXC correspond au site actif d'enzymes de la superfamille des thiorédoxines comme la PDI (protein disulphide isomerase) qui catalysent la formation de ponts disulfure dans des protéines nouvellement synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique.

B.2.2. Biosynthèse et hétérodimérisation des deux sous-unités

Les deux sous-unités α_{IIb} et β_3 sont traduites à partir de leur ARNm en précurseurs comportant une chaîne unique (Duperray et al., 1987). Les plaquettes produisent 5 fois plus de précurseur pour α_{IIb} que pour β_3 et toutes les molécules de β_3 sont assemblées en hétérodimères alors que le surplus de molécules α_{IIb} est dégradé (Rosa & McEver, 1989). L'association des deux sous-unités au niveau du réticulum endoplasmique est une étape importante de maturation nécessaire à l'expression du récepteur fonctionnel à la surface de la cellule (Duperray et al., 1989; O'Toole et al., 1989). Après leur assemblage au niveau du réticulum, les hétérodimères sont transportés dans l'appareil de Golgi où différentes modifications post-traductionnelles ont lieu. Le clivage de la sous-unité α_{IIb} en deux chaînes, reliées par un pont disulfure, constitue une étape ultime dans la maturation de l'intégrine (Calvete, 1995) et en absence de ce clivage, le récepteur n'est pas fonctionnel (Iwamoto et al., 1994). L'absence d'une des sous-unités, lors de la formation du complexe $\alpha\beta$, empêche la maturation de la sous-unité isolée et conduit à sa dégradation intracellulaire (Bray, 1994). Le domaine cytoplasmique de α_{IIb} et notamment la séquence conservée

INTRODUCTION

GFFKR semble jouer un rôle important pour l'expression à la surface de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. En effet il a été montré que dans des lymphocytes B, la substitution de ce motif GFFKR par un motif polyalanine (AAAAA) ainsi que la délétion des 18 acides aminés C-terminaux de α_{IIb} empêchent l'exposition à la surface de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ recombinante transfectée.

C. Spécificité de reconnaissance

Initialement, différents ligands de $\alpha_{IIb}\beta_3$ comme le fibrinogène (fg), le vWF, la fibronectine, la vitronectine, la thrombospondine ou différents collagènes ont été identifiés, possédant chacun au moins une copie du tripeptide RGD (Plow et al., 1985; Ruoslahti & Pierschbacher, 1987). Par la suite, d'autres ligands comme ICAM-4 ou CD40L ont été identifiés, interagissant avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ de manière RGD-indépendante (Andre et al., 2002; Hermand et al., 2003). Parmi tous ces ligands, le fibrinogène (fg) est le mieux étudié à cause de l'importance de son interaction avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ lors de l'adhérence et l'agrégation plaquettaire.

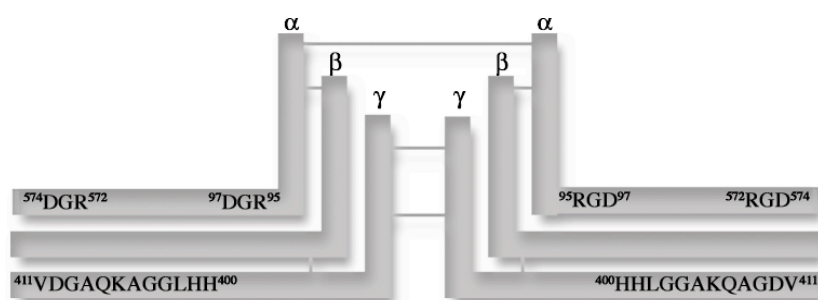


Figure 9: Représentation schématique du fibrinogène

Le fg est composé de trois paires de chaînes polypeptidiques α , β et γ et contient deux types de motifs d'interaction avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$: la séquence « RGD » et la séquence dodécapeptide « HHLGGAKQAGDV ». Chaque chaîne α contient deux motifs RGD et chaque chaîne γ contient une séquence dodécapeptide.

C.1. Le fibrinogène (fg)

Le fg est une glycoprotéine du plasma sanguin, synthétisée au niveau du foie et composée de trois paires de chaînes polypeptidiques, $(A\alpha)_2$, $(B\alpha)_2$ et $(\gamma)_2$ (Figure 9). Alors que l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, dans son état inactif, peut interagir avec du fg immobilisé, son interaction avec le fg soluble dans le sang nécessite son activation au préalable (O'Toole et al., 1990). L'importance du fg en hémostase est soulignée par les syndromes hémorragiques de patients ayant des anomalies qualitatives (dysfibrinogénie) ou quantitatives (afibrinogénie) du fg (Lane et al., 1980; Neerman-Arbez et al., 2000). De plus, des souris transgéniques déficientes en fg présentent des défauts comparables à la thromasténie de Glanzmann chez les humains, c'est-à-dire une agrégation plaquettaire déficiente et des temps de saignement prolongés (Suh et al., 1995).

Le fg contient plusieurs copies de deux motifs différents, capables d'interagir avec $\alpha_{IIb}\beta_3$: un motif RGD et une séquence dodécapeptide de 12 acides aminés. Les motifs RGD sont localisés au niveau des aa 95-97 et 572-574 de chaque chaîne α (soit 4 par molécule de fg) (Figure 9) (Doolittle et al., 1979; Hawiger et al., 1989). Des peptides correspondant à cette séquence RGD inhibent l'interaction du fg avec $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Lam et al., 1987; Parise et al., 1987; Ruoslahti & Pierschbacher, 1987) et des expériences de couplage chimique ont montré que les résidus 109 à 171 de β_3 (troisième et quatrième segment répétitif de l'hélice β) sont en contact avec un peptide RGD interagissant avec l'intégrine (D'Souza et al., 1988). Récemment, la structure cristalline d'une partie extracellulaire de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, en complexe avec un ligand RGD, a permis d'identifier les résidus importants pour cette interaction au niveau de l'hélice β de la sous-unité β et du domaine I-like de la sous-unité α de l'intégrine (Xiong et al., 2002). La séquence dodécapeptide (HHLGGAKQAGDV) est localisée au niveau des résidus 400 à 411 de chaque chaîne α du fg (soit 2 par molécule de fg) (Figure 9) et des peptides contenant cette séquence inhibent également l'interaction du fg avec $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Kloczewiak et al., 1982; Kloczewiak et al., 1984). Alors que des peptides RGD ont une plus forte affinité *in vitro* pour $\alpha_{IIb}\beta_3$ que la séquence dodécapeptide, de nombreuses études ont suggéré que l'interaction de $\alpha_{IIb}\beta_3$ avec le fg, soluble ou

INTRODUCTION

immobilisé, est essentiellement réalisée par la séquence dodécapeptide (Kloczewiak et al., 1982; Kloczewiak et al., 1983; Cheresch et al., 1989; Smith et al., 1990; Farrell et al., 1992; Farrell & Thiagarajan, 1994; Savage et al., 1995; Zaidi et al., 1996). Ainsi, le fg, délété de la séquence ⁴⁰⁸AGDV⁴¹¹ au niveau des sites dodécapeptide, n'est plus capable de promouvoir l'agrégation plaquettaire *in vitro* (Rooney et al., 1996) et *in vivo* (Holmback et al., 1996) alors que des mutations de la séquence RGD du fg n'abolissent pas l'agrégation des plaquettes mais la rétraction du caillot sanguin (Farrell et al., 1992).

D. Signalisation à travers l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

Comme les plaquettes sanguines sont des particules cellulaires sans noyau, leur étude par les techniques classiques de biologie moléculaire et cellulaire est difficile, voir impossible. C'est pourquoi différents systèmes cellulaires sont utilisés pour étudier la signalisation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Des études menées dans des cellules CHO ont montrées que l'interaction de $\alpha_{IIb}\beta_3$ avec le fg provoque différentes réponses cellulaires comme le clustering des intégrines, des réarrangements au niveau du cytosquelette et la formation d'AF, résultant de la signalisation outside-in de l'intégrine (Haimovich et al., 1993; Yamada & Miyamoto, 1995). D'un autre côté, l'affinité de l'interaction de $\alpha_{IIb}\beta_3$ avec le fg est régulée par un changement conformationnel, induit à partir des parties cytoplasmiques de l'intégrine (signalisation inside-out). La fixation du fg est accompagnée de l'exposition de nouveaux épitopes LIBS (ligand induced binding site) sur la partie extracellulaire de $\alpha_{IIb}\beta_3$, qui se trouvent la plupart du temps assez loin du site de fixation du fg. Ainsi l'anticorps anti-LIBS2 se fixe au niveau des «jambes» de $\alpha_{IIb}\beta_3$, quelque 400 acides aminés en aval du site de fixation du fg (Du et al., 1993). Cette observation confirme que des changements conformationnels peuvent se propager sur de longues distances à travers l'intégrine.

D.1. La signalisation outside-in

L'interaction du fg avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ induit un certain nombre de réponses cellulaires comme le clustering des intégrines, l'activation de cascades de signalisation intracellulaires et la réorganisation du cytosquelette (Yamada & Miyamoto, 1995). Des études menées dans des plaquettes et dans des cellules CHO ont montré que la fixation du fg par l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ induit une cascade de phosphorylation de tyrosines de différentes protéines de signalisation comme la FAK (focal adhesion kinase), Src et Shc (Kornberg et al., 1991; Lipfert et al., 1992). Ces phosphorylations mènent à l'activation de diverses voies de signalisation comme celle de la PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) ou encore celle de Rho, Rac ou Cdc42, des membres de la famille des petites GTPases qui sont responsables de la réorganisation du cytosquelette d'actine et de la formation de structures comme les adhérences focales, les filopodes ou les lamellipodes (Ridley et al., 1992; Nobes & Hall, 1995; Keely et al., 1997; Clark et al., 1998). Ainsi il a été montré que l'activation de Rho mène à la formation des adhérences focales (Hall, 1998; Leng et al., 1998; Burridge & Wennerberg, 2004) alors que l'activation de Rac est responsable de la formation de lamellipodes (Miranti et al., 1998). De nos jours, de plus en plus de protéines, impliquées dans ces cascades de signalisation complexes et interconnectées, sont identifiées, rendant l'étude du mécanisme de la signalisation outside-in des intégrines de plus en plus difficile.

D.2. La signalisation inside-out

Lors de la signalisation inside-out, des signaux intracellulaires permettent aux intégrines d'augmenter l'affinité pour leur ligand extracellulaire en un laps de temps inférieur à la seconde. Des études structurales (Vinogradova et al., 2000; Vinogradova et al., 2002; Weljie et al., 2002; Vinogradova et al., 2004), biochimiques (Lu et al., 2001; Tadokoro et al., 2003) et cellulaires (Kim et al., 2003) ont permis de mettre au point un modèle selon lequel l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ serait contrainte dans un état inactif par un pont salin entre le résidu Arg⁹⁹⁵ de α_{IIb} et le résidu Asp⁷²³ de β_3 (Hughes et al.,

INTRODUCTION

1996). L'interaction des parties cytoplasmiques avec des protéines cytoplasmiques entraînant la rupture de cette interaction et la séparation spatiale des parties cytoplasmiques semble être une dernière étape commune de la signalisation inside-out menant à l'activation de l'intégrine (Calderwood, 2004a). Ainsi la taline interagit via son domaine globulaire avec la partie cytoplasmique de β_3 , induisant la rupture de l'interaction des parties cytoplasmiques de $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Vinogradova et al., 2002), leur séparation spatiale (Kim et al., 2003) et l'activation de l'intégrine (Calderwood et al., 2002). La β_3 -endonexine, qui interagit avec le motif $^{756}\text{NITY}^{759}$ de la partie cytoplasmique de β_3 (Shattil et al., 1995; Eigenthaler et al., 1997; Kashiwagi et al., 1997), ainsi que AUP-1 (ancien ubiquitous protein 1) (Kato et al., 2002) et CIB (calcium- and integrin-binding protein) (Barry et al., 2002; Naik & Naik, 2003), qui interagissent avec la séquence conservée $^{989}\text{KVGFFKR}^{995}$ de la partie cytoplasmique de α_{IIb} , sont d'autres protéines régulatrices de l'activation de $\alpha_{IIb}\beta_3$. Même si cette dernière étape de l'activation de l'intégrine a bien été étudiée, les mécanismes de signalisation précédant cette étape restent largement inconnus.

Remarque

Une étude structurale toute récente a défini la structure cristalline de la partie extracellulaire de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Xiao et al., 2004). Vu l'envergure de cette étude, ces nouveaux résultats tout récents n'ont pas pu être intégrés dans toute la partie introduction de cette thèse et nous nous contentons ici d'un résumé des résultats publiés.

La structure cristalline de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ a permis de définir, à une résolution atomique, les sites de contact avec un ligand au niveau du domaine en hélice α de la sous-unité α_{IIb} et du domaine I-like de la sous-unité β_3 . De plus, ces résultats fournissent un modèle structural pour l'activation conformationnelle de l'intégrine, montrant qu'en présence d'un ligand, le domaine I-like est réorienté de 62° par rapport au domaine hybride. Cette réorientation se transmet à travers «les jambes» de l'intégrine et provoque une séparation de 70 \AA des deux sous-unités au niveau de leurs «genoux», qui s'accompagne du redressement de la partie extracellulaire de l'intégrine. Cette séparation des deux sous-unités au niveau des «genoux» pourrait

également expliquer la séparation des parties transmembranaires et cytoplasmiques dans l'état activé de l'intégrine. Après la réalisation de la première structure cristalline d'une intégrine ($\alpha_v\beta_3$) en 2001 (Xiong et al., 2001), cette étude constitue un deuxième grand pas dans la compréhension du fonctionnement allostérique des intégrines et permettra sûrement de mieux interpréter les résultats d'étude de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Chapitre III

La connexion des intégrines β_3 au cytosquelette d'actine

L'interaction des intégrines avec leurs ligands extracellulaires entraîne le clustering des intégrines à la surface membranaire et la connexion de ces clusters au cytosquelette d'actine (Hynes, 2002). Ainsi sont formées les adhérences focales qui constituent des points d'ancrage de la cellule à la MEC. Cette connexion est essentielle pour l'adhérence des cellules mais intervient également dans l'établissement de la polarité de la cellule et par conséquent dans la migration cellulaire (Brakebusch et al., 2002). La connexion des intégrines au cytosquelette est hautement dynamique et est soumise à des régulations et réorganisations permanentes. Au niveau du front de migration de la cellule, les intégrines recrutent le cytosquelette d'actine et entraînent ainsi sa réorganisation, en formant différents types de protubérances cellulaires comme les lamellipodes, dans lesquels les intégrines localisent tout le long de la membrane plasmique. À l'arrière de la cellule par contre, le détachement des intégrines de la MEC induit la rupture du lien avec le cytosquelette (Ballestrem et al., 2001; Laukaitis et al., 2001).

A. Les adhérences focales (AF)

Lors de l'adhérence d'une cellule à la MEC, les intégrines se regroupent à la surface membranaire en complexes qui constituent les véritables points d'ancrage de la cellule. Ces complexes s'organisent d'abord à la périphérie de la cellule où ils sont appelés complexes focaux ou points focaux. Les complexes focaux peuvent accroître en taille lors de leur maturation pour former les AF (Rottner et al., 1999; Ballestrem et al., 2001). Ces AF assurent le lien mécanique entre la MEC et le cytosquelette de la cellule. Elles sont constituées de nombreuses protéines cytoplasmiques structurales ou adaptatrices comme la vinculine, la paxilline, la taline, la tensine, la filamine, la TES, l' α -actinine ou l'actine (Figure 10).

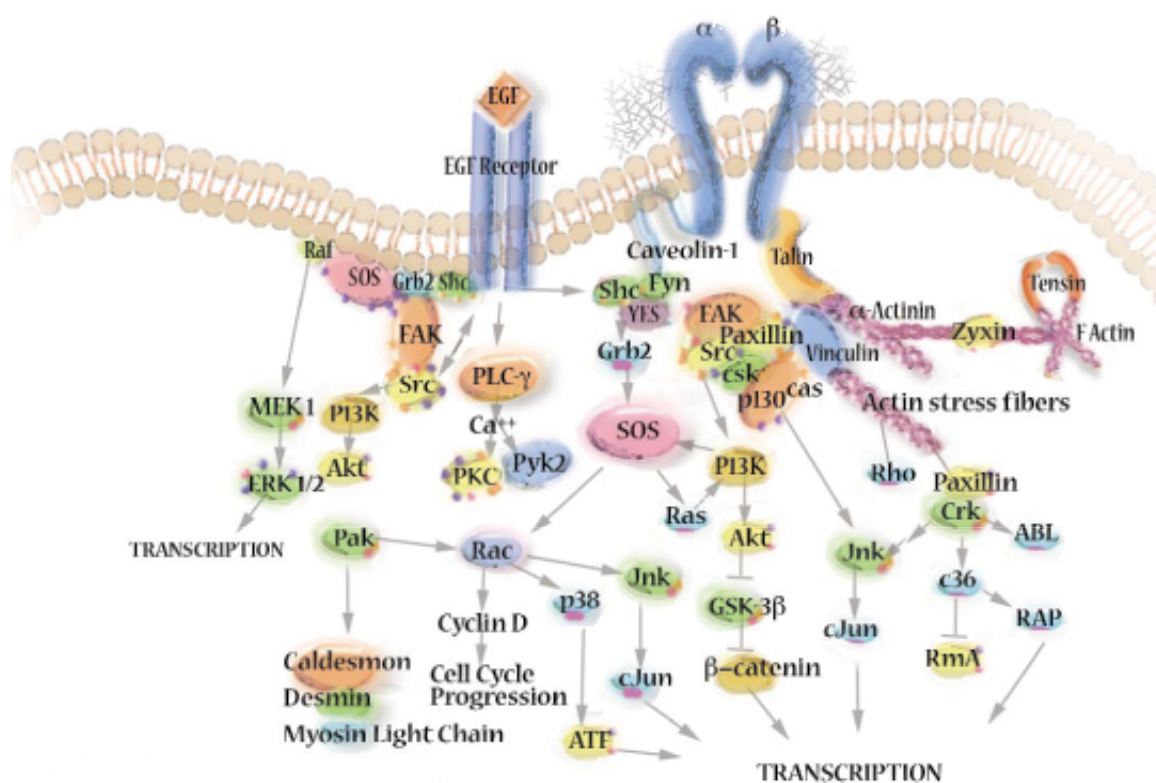


Figure 10: Représentation schématique des cascades de signalisation initiées par les intégrines au niveau des adhérences focales (AF)

Les AF, qui assurent le lien mécanique entre la MEC et le cytosquelette d'actine, sont des complexes de protéines structurales, adaptatrices et de signalisation. Le schéma montre les protéines structurales recrutées au niveau cytoplasmique des intégrines ainsi que différentes voies de signalisation des intégrines et la connexion de ces voies à la signalisation des récepteurs de croissance. Figure modifiée d'après BioSource International Inc. (<http://www.biosource.com>).

Un grand nombre de ces protéines, recrutées au niveau des AF, interagissent directement avec les parties cytoplasmiques des intégrines (Liu et al., 2000; Geiger et al., 2001; Zamir & Geiger, 2001) (Tableau 2). Les AF sont également les lieux de la transduction des signaux induisant des cascades de signalisation intracellulaires (Zamir & Geiger, 2001). Elles contiennent donc également des protéines de signalisation comme celles de la famille src des protéines kinases (Lim, 2002), l'ILK (Hannigan et al., 1996) ou encore la FAK (Schaller, 2001) (Tableau 2). De plus les voies de signalisation intracellulaires, activées par les intégrines, sont interconnectées à d'autres voies de signalisation, comme par exemple celle des récepteurs EGF (Figure 10).

Les AF ne constituent pas des points d'ancrage statiques mais des complexes hautement dynamiques (Zaidel-Bar et al., 2003). C'est cette dynamique des AF qui permet aux cellules de contrôler l'adhérence, l'étalement et la migration. C'est pourquoi de nombreux efforts sont actuellement consacrés à comprendre les interactions protéiques au sein des AF, leur dynamique et leur régulation. Même si on commence à bien comprendre le rôle de certaines de ces protéines, il n'existe actuellement pas encore de modèle cohérent permettant d'expliquer la régulation des AF.

B. Le cytosquelette d'actine - les filaments d'actine et leur dynamique

Au niveau du cytosquelette, l'actine monomérique (G-actine) est polymérisée en filaments de F-actine. La polymérisation est polaire et l'orientation des filaments peut être caractérisée par l'addition de domaines globulaires de la myosine. Ces domaines se fixent latéralement sur les filaments d'actine et révèlent un bout du filament en forme de «**crochet**» (également appelé extrémité +) alors que l'autre bout apparaît «**pointu**» (appelé extrémité -). La polymérisation de la G-actine en F-actine a toujours lieu à l'extrémité + alors qu'à l'extrémité -, la dépolymérisation libère de la G-actine. Ce processus est connu sous le nom de «**mouvement de tapis roulant**» ou encore sous le nom de «**treadmilling**» (en référence à une roue à hamster, une roue à cheville ou encore une trépineuse) (Wegner, 1976; Pollard & Mooseker, 1981; Holmes et al., 1990; Pantaloni et al., 2001).

INTRODUCTION

Protéine	Intégrines	Remarques	Références
Protéines structurales			
taline			
domaine globulaire	α_1, α_2 et α_3	Active un grand nombre d'intégrines	(Knezevic et al., 1996; Pfaff et al., 1998; Goldmann, 2000; Tadokoro et al., 2003)
domaine élongé	α_1 et α_3		(Horwitz et al., 1986; Xing et al., 2001)
F-actine	α_2		(Kieffer et al., 1995)
β -actinine	α_1 et α_2		(Otey et al., 1990; Pavalko & Burridge, 1991; Cattelino et al., 1999)
filamine	$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ et α_7		(Pavalko et al., 1989; Loo et al., 1998; Pfaff et al., 1998; Goldmann, 2000)
myosine	α_3	Interaction dépend de l'état de phosphorylation de α_3	(Jenkins et al., 1998; Sajid et al., 2000)
skélémine	α_1 et α_3		(Reddy et al., 1998)
Protéines de signalisation			
FAK	α_1, α_2 et α_3		(Schaller et al., 1995; Chen et al., 2000)
ILK	α_1 et α_3		(Hannigan et al., 1996)
cytohésine-1	α_2		(Kolanus et al., 1996)
cytohésine-3	α_2		(Hmama et al., 1999)
c-Src	α_3		(Arias-Salgado et al., 2003)
Fyn	α_3		(Arias-Salgado et al., 2003)
Hck	α_1, α_2 et α_3		(Arias-Salgado et al., 2003)
Lyn	α_1, α_2 et α_3		(Arias-Salgado et al., 2003)
c-Yes	α_1, α_2 et α_3		(Arias-Salgado et al., 2003)
Autres protéines			
Paxilline	$\alpha_4, \alpha_9, \alpha_1$ et α_3		(Schaller et al., 1995; Liu et al., 1999; Chen et al., 2000; Liu et al., 2001)
α_3 -endonexine	α_3	Active α_{IIIb}	(Shattil et al., 1995; Eigenthaler et al., 1997)
Calréticuline	α		(Rojiani et al., 1991; Leung-Hagesteijn et al., 1994; Coppelino et al., 1995)
Cavéoline-1	α		(Wary et al., 1998)
Melusine	α_1		(Brancaccio et al., 1999)
Grb2	α_3		(Law et al., 1996)
Shc	α_3		(Law et al., 1996)
TAP-20	α_5		(Tang et al., 1999)
CIB	α_{Ib}		(Naik et al., 1997; Shock et al., 1999; Vallar et al., 1999)
Rack-1	α_1, α_2 et α_5		(Liliental & Chang, 1998)
WAVE-1	α_7		(Rietzler et al., 1998)
JAB1	α_2		(Bianchi et al., 2000)
MIBP	α_1		(Li et al., 1999a)
ICAP-1	α_1		(Chang et al., 1997; Zhang & Hemler, 1999)
CD98	α_1 et α_3		(Zent et al., 2000)
DRAL/FHL2	α_3, α_7 et α		(Wixler et al., 2000)
BIN1	α_3		(Wixler et al., 1999)
Mss4	α_3		(Wixler et al., 1999)
Syk	α_1, α_2 et α_3		(Woodside et al., 2001; Woodside et al., 2002)
ZAP-70	α_1, α_2 et α_3		(Woodside et al., 2001; Woodside et al., 2002)
Aup1	α_{Ib}		(Kato et al., 2002)
plectine	α_4		(Koster et al., 2001)

Tableau 2: Protéines interagissant directement avec la partie cytoplasmique des intégrines

Au niveau des lamellipodes de cellules comme les kératinocytes ou leucocytes, exhibant une migration rapide, l'addition continue de G-actine à l'extrémité + des filaments d'actine déplace le lamellipode et la membrane vers l'avant (Rottner et al., 1999; Borisy & Svitkina, 2000; Geiger & Bershadsky, 2001). Dans des cellules plus stationnaires, à migration lente, comme les fibroblastes, les filaments de F-actine s'assemblent pour former des fibres de stress qui forment des lignes de tension entre les points d'ancrage à la MEC, c'est-à-dire les AF. Ces fibres de stress sont orientées avec leur extrémité + vers les AF et l'incorporation de la G-actine a donc lieu au niveau des AF (Watanabe et al., 1999; Rivelino et al., 2001).

C. Protéines impliquées dans la dynamique du cytosquelette d'actine

De nombreuses protéines interviennent au niveau du lien entre les intégrines et le cytosquelette d'actine et un grand nombre de ces protéines interagissent directement avec la partie cytoplasmique des intégrines (Tableau 2). Comme les parties cytoplasmiques des intégrines n'interagissent pas directement avec l'actine, certaines de ces protéines jouent un rôle structural de connexion alors que d'autres assurent et régulent la polymérisation, la dépolymérisation et l'interconnexion des filaments d'actine. Ici nous allons nous focaliser sur certaines de ces protéines qui nous semblent particulièrement importantes pour la transduction de signaux à travers les intégrines et l'organisation du cytosquelette d'actine.

C.1. La taline

Comme l'ensemble de ce travail est focalisé sur la taline, qui joue un rôle central dans la connexion des intégrines au cytosquelette, tout le chapitre IV de cette introduction a été consacré à la taline et son rôle ne sera pas discuté d'avantage ici.

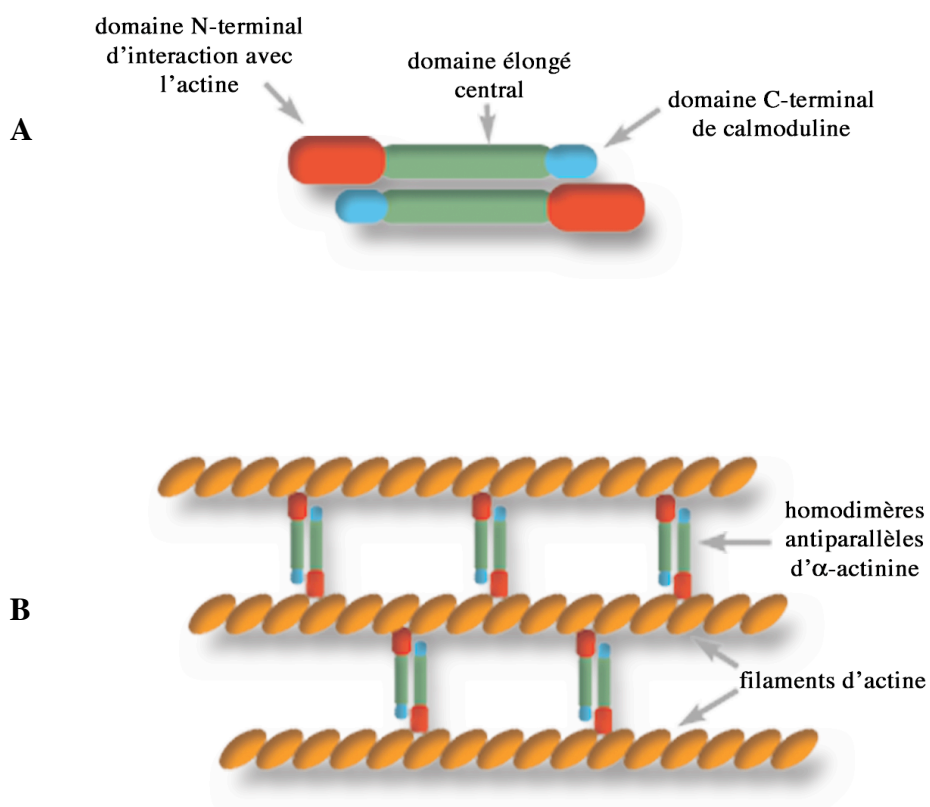


Figure 11: Structure de l' α -actinine

(**A**) Homodimère antiparallèle d' α -actinine. Chaque molécule d' α -actinine est composée d'un domaine N-terminal d'interaction avec l'actine, d'un domaine élongé central et d'un domaine C-terminal d'homologie avec la calmoduline. (**B**) Les homodimères d' α -actinine relient des filaments d'actine parallèles.

C.2. L' α -actinine

L' α -actinine est une protéine exprimée de manière ubiquitaire dans tous les organismes et est considérée comme molécule ancestrale d'une famille de protéines interagissant avec l'actine, comprenant la spectrine, la dystrophine et l'utrophine (Blanchard et al., 1989; Pascual et al., 1997).

Elle est composée d'un domaine N-terminal d'interaction avec l'actine, d'un domaine élongé central et d'un domaine putatif de calmoduline du côté C-terminal (Davison & Critchley, 1988; Castresana & Saraste, 1995; Trave et al., 1995) et s'assemble en homodimères antiparallèles (Figure 11A). Au niveau de ces homodimères, les deux sites d'interaction avec l'actine se trouvent aux extrémités opposées de la molécule et permettent la connexion de deux filaments d'actine parallèles (Figure 11B) (Djinovic-Carugo et al., 1999; Brakebusch & Fassler, 2003; Otey & Carpen, 2004).

De plus l' α -actinine peut connecter les filaments d'actine à des complexes de la membrane cellulaire, soit de manière directe en interagissant avec des récepteurs cellulaires comme les intégrines (Otey et al., 1990), les IgCAMs (Carpen et al., 1992; Heiska et al., 1996) et les sélectines (Pavalko 1995 129), soit de manière indirecte en interagissant avec des protéines structurales comme la vinculine (Wachsstock 1987) ou la zyxine (Crawford et al., 1992; Li & Trueb, 2001). Des protéines de signalisation comme Erk1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) (Leinweber et al., 1999), MEKK1 (mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase 1) (Christerson et al., 1999), PKN (protein kinase N) (Mukai et al., 1997) et PI3K (Shibasaki et al., 1994) interagissent avec l' α -actinine et ces interactions sont régulées par des phosphoinositides. En effet PIP₂ active l'interaction de l' α -actinine avec la PKN et la PI3K (Fukami et al., 1994; Shibasaki et al., 1994; Mukai et al., 1997) alors que PIP₃ inhibe l'interaction avec les intégrines (Greenwood et al., 2000). De plus la phosphorylation de l' α -actinine par la FAK inhibe son association avec l'actine (Izaguirre et al., 2001).

Le rôle important de l' α -actinine dans la connexion du cytosquelette d'actine aux récepteurs membranaires a été souligné récemment *in vivo* dans des fibroblastes murins, par l'inactivation à l'aide d'un faisceau laser d'une protéine α -actinine recombinante, fusionnée à GFP (green fluorescent protein). En effet, cette étude a

INTRODUCTION

montré que l'inactivation de l' α -actinine entraînait le détachement de fibres de stress des AF alors que l'intégrité des AF mêmes n'était pas affectée (Rajfur et al., 2002).

C.3. La vinculine

La vinculine, dont le rôle structural et fonctionnel sera discuté de manière plus détaillée dans le chapitre IV, contient entre autres des sites d'interaction avec la taline, l' α -actinine et l'actine, lui permettant d'intervenir dans le lien intégrines – cytosquelette. L'interaction de la vinculine avec la taline ou avec du PIP_2 expose les sites masqués pour l' α -actinine et l'actine (Johnson & Craig, 1994; Gilmore & Burridge, 1996; Weekes et al., 1996; Steimle et al., 1999; Bass et al., 2002). À part son rôle structural, la vinculine peut indirectement induire la polymérisation de G-actine en F-actine en recrutant le complexe de signalisation Arp2/3, qui possède la capacité d'initier la nucléation de filaments d'actine (DeMali et al., 2002).

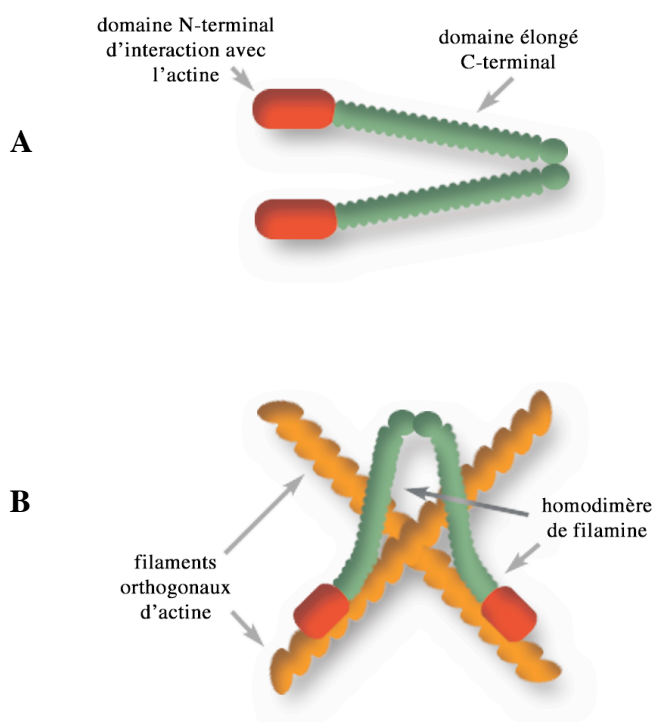


Figure 12: Structure de la filamine

(A) Homodimère de filamine. Chaque molécule de filamine est composée d'un domaine globulaire N-terminal d'interaction avec l'actine et d'un domaine élongé C-terminal constitué de multiples motifs répétés de 100 résidus environ. La dimérisation des molécules a lieu du côté C-terminal. (B) Les homodimères de filamine peuvent relier les filaments d'actine en un réseau orthogonal.

C.4. La filamine

La filamine est une protéine de 280 kDa environ, composée d'un domaine globulaire, qui contient un site d'interaction avec l'actine, et d'un domaine élongé, constitué de séquences répétitives de 100 acides aminés environ (Stossel et al., 2001; van der Flier & Sonnenberg, 2001). Les molécules de filamine s'assemblent de manière non-covalente du côté C-terminal (Figure 12A) et relient les filaments d'actine en un réseau orthogonal de filaments parallèles (Yamazaki et al., 2002) (Figure 12B).

Avec leur domaine élongé, les filamines peuvent interagir avec des récepteurs membranaires comme les intégrines (Sharma et al., 1995; Loo et al., 1998; Feng et al., 2003; Travis et al., 2004) ou avec des protéines de signalisation comme les GTPases Rho (Ohta et al., 1999), la MEKK (Marti et al., 1997), la PKC α (protein kinase C alpha) (Tigges et al., 2003) ou les GEFs (guanidine nucleotide exchange factors) (Bellanger et al., 2000).

De nombreuses études génétiques sur des lignées cellulaires humaines (Eksioglu et al., 1996; Fox et al., 1998; Robertson et al., 2003), chez *Dictyostelium* (Witke et al., 1992; Fisher et al., 1997; Rivero et al., 1999) ou chez la drosophile (Li et al., 1999b; Sokol & Cooley, 1999) ont mis en évidence l'importance de la filamine au niveau de l'organisation du cytosquelette et de la migration cellulaire. La filamine et l' β -actinine semblent avoir des fonctions redondantes. En effet, alors que la délétion de l' β -actinine chez *Dictyostelium* résulte dans un phénotype assez modéré, la double délétion de l' β -actinine et du facteur de gélation, qui est l'équivalent de la filamine chez *Dictyostelium*, résulte dans une taille cellulaire et une prolifération réduite, une migration anormale et une cytokinèse partiellement défectueuse (Witke et al., 1992; Rivero et al., 1999).

D. La signalisation des intégrines vers le cytosquelette d'actine

L'interaction des intégrines avec leurs ligands et le clustering des intégrines qui s'ensuit, induisent des cascades de signalisation au niveau intracellulaire qui régulent la dynamique des filaments d'actine. La famille des GTPases Rho semble jouer un

INTRODUCTION

rôle prépondérant dans ce mécanisme. Ces molécules sont essentielles pour l'organisation du cytosquelette et induisent des structures actine-dépendantes spécifiques comme les fibres de stress (suite à l'activation de RhoA), les lamellipodes (après activation de Rac1) ou les filopodes (dépendants de Cdc42) (Etienne-Manneville & Hall, 2002; Raftopoulou & Hall, 2004). Les intégrines peuvent stimuler les GTPases Rho par différentes cascades de signalisation parmi lesquelles deux semblent particulièrement importantes : celle de la FAK et celle des kinases src (Schaller, 2001; Arthur et al., 2002). Des études récentes ont suggéré que l'ICAP-1 (integrin cytoplasmic domain-associated protein-1) et l'ILK (integrin linked kinase) affectent également le lien entre les intégrines et le cytosquelette (Wu & Dedhar, 2001; Bouvard et al., 2003) via la stimulation des GTPases Rho (Degani et al., 2002; Rosenberger et al., 2003).

D.1. La FAK

La FAK est une tyrosine kinase qui est composée d'un domaine kinase central, hautement conservé, et de deux larges domaines N- et C-terminaux. Le domaine C-terminal contient une séquence FAT (focal adhesion targeting) (Hildebrand et al., 1993), responsable de sa localisation au niveau des AF (Hanks et al., 1992; Schaller et al., 1992) ainsi que des sites d'interaction avec la paxilline et le domaine globulaire de la taline (Chen et al., 1995; Hildebrand et al., 1995). Le domaine N-terminal de la FAK interagit avec de peptides mimétiques de la partie cytoplasmique de β_1 , suggérant une interaction directe avec les intégrines (Schaller et al., 1995). Néanmoins, cette interaction n'a jamais été confirmée *in vivo*.

L'interaction des intégrines avec la MEC et le recrutement de la FAK induisent son autotransphosphorylation au niveau du résidu Y³⁹⁷, soit directement suite au clustering des intégrines, soit suite à la phosphorylation par Src des résidus Y⁵⁷⁶ et Y⁵⁷⁷, qui accroît l'activité catalytique de la FAK (Schaller, 2001). La FAK activée peut lier et phosphoryler un certain nombre de substrats menant au recrutement d'autres protéines adaptatrices et protéines de signalisation au niveau des AF. Ainsi le résidu Y³⁹⁷ phosphorylé de la FAK peut lier des protéines contenant un domaine SH2 comme les kinases Src (Schlaepfer & Hunter, 1997), la Grb7 (Han & Guan, 1999), la PI3K

(Reiske et al., 1999) ou la PLC β (Zhang et al., 1999), le résidu phosphorylé Y⁹²⁵ interagit avec la protéine Grb2 et une région riche en proline du côté C-terminal de la FAK interagit avec des protéines possédant un domaine SH3 comme la p130Cas ou la GRAF (Brakebusch & Fassler, 2003; Schlaepfer & Mitra, 2004). Les GTPases Rho peuvent être activées par la FAK via différents mécanismes: i) le complexe p130Cas – Crk – DOCK180 peut activer Rac1 menant à la formation de lamellipodes (Kiyokawa et al., 1998), ii) la production de PIP₃ par la PI3K active des protéines GEF qui à leur tour stimulent les GTPases Rho (Das et al., 2000), iii) la FAK peut interagir directement (ou indirectement par l'intermédiaire de la paxilline) avec la protéine adaptatrice GIT1 et avec des protéines GEF qui activent les GTPases Rho Rac1 et Cdc42 (Turner et al., 1999; Zhao et al., 2000) et finalement iv) les protéines GEF peuvent être phosphorylées et activées par les kinases Src (Crespo et al., 1997; Han et al., 1997; Teramoto et al., 1997). En résumé, la signalisation des intégrines induit la formation de divers complexes phosphoprotéiques agissant sur le cytosquelette d'actine. L'activation des GTPases Rho RhoA, Rac1 et Cdc42 semble jouer un rôle clé dans ces cascades, mais à l'heure actuelle on est encore loin de disposer d'un modèle précis de la signalisation intégrine-dépendante, intégrant les nombreuses interactions et régulations complexes des composantes de ce mécanisme.

D.2. L'ILK (integrin linked kinase)

L'ILK a été identifiée comme Ser/Thr kinase qui interagit avec les parties cytoplasmiques des sous unités β_1 , β_2 et β_3 des intégrines (Hannigan et al., 1996). La partie N-terminale de l'ILK contient un domaine ANK, composé de 4 motifs ankyrin répétés, suivi d'un domaine PH (pleckstrin homology)-like alors que la partie C-terminal contient un domaine qui présente une forte homologie avec le domaine catalytique de nombreuses protéines kinases.

La surexpression de l'ILK dans des cellules induit la phosphorylation d'autres protéines kinases comme la PKB et la GSK-3 β (Delcommenne et al., 1998). L'identification de PKB/Akt comme cible de l'ILK peut expliquer le mécanisme de la prolifération et survie cellulaire dépendant de l'adhérence cellulaire. En effet, les cellules nécessitent des signaux de survie en provenance des récepteurs de la MEC, en

INTRODUCTION

absence desquels l'apoptose est induite (anoikis) (Ruoslahti & Reed, 1994). La GSK-3 β , qui est phosphorylée par l'ILK, est un régulateur d'une voie de signalisation appelée *Wnt* (Cohen & Frame, 2001). Cette voie de signalisation mène à l'expression de cycline D1 et *c-myc* au niveau du noyau cellulaire. La surexpression de l'ILK induit l'expression de cycline D1 et résulte ainsi dans une croissance tumorale indépendante de l'adhérence (Novak et al., 1998; White et al., 2001).

Malgré cette découverte, la phosphorylation *in vivo* d'autres cibles par l'ILK n'a jamais été démontrée de manière convaincante et de nombreuses études génétiques au niveau de la drosophile, de *Caenorhabditis elegans* et de la souris ont semé récemment un doute sur le rôle de l'activité kinase de l'ILK. En effet, la délétion du gène de l'ILK chez la drosophile et chez *C. elegans* a révélé des anomalies au niveau des muscles (Zervas et al., 2001; Mackinnon et al., 2002), alors qu'aucune anomalie de la voie de signalisation *Wnt* ou de l'activité de PKB/Akt n'a pu être mise en évidence chez la drosophile (Zervas et al., 2001). De plus les défauts observés ont pu être réprimés par l'introduction d'un gène ILK, dépourvu de son activité kinase (Zervas et al., 2001; Mackinnon et al., 2002). De même des cellules de souris, délétées du gène de l'ILK, présentent des défauts d'adhérence et de prolifération (Sakai et al., 2003) alors que PKB/Akt et GSK-3 β sont phosphorylées normalement (Grashoff et al., 2003; Sakai et al., 2003).

Les nombreuses études génétiques de l'ILK au niveau de lignées cellulaires humaines, chez la souris, la drosophile et *C. elegans* (Zervas et al., 2001; Hill et al., 2002; Mackinnon et al., 2002; Grashoff et al., 2003; Sakai et al., 2003) suggèrent un rôle important de l'ILK dans l'organisation du cytosquelette d'actine et de sa connexion aux intégrines. En effet l'ILK possède de nombreux sites d'interaction avec des protéines comme la paxilline (Nikolopoulos & Turner, 2001), PINCH-1 et PINCH-2 (Zhang et al., 2002; Braun et al., 2003), l'actopaxine (Nikolopoulos & Turner, 2000), également connue sous le nom de CH-ILKBP (calponin homology-ILK binding protein) (Tu et al., 2001b), et l' β -parvin (Olski et al., 2001). Toutes ces protéines sont impliquées de manière directe ou indirecte dans l'organisation du cytosquelette. Ainsi PINCH-1 et PINCH-2 interagissent avec une protéine adaptatrice Nck2 (également connu sous le nom de Grb4) (Tu et al., 2001a). Nck2 peut d'un côté interagir via son domaine SH2 avec des résidus phosphorylés de récepteurs comme les EGFR (epidermal growth factor receptor) ou les PDGFR (platelet-derived growth factor

receptor), reliant ainsi potentiellement les intégrines à la signalisation des récepteurs de facteurs de croissance, et d'un autre côté via son domaine SH3 avec des protéines comme WASp (Wiskott-Aldrich Syndrome protein), DOCK180 (180 kDa protein downstream of Crk) et PAK (p21-activated kinase), toutes impliquées dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine (Tu et al., 2001a; Tu et al., 2001c; Brakebusch & Fassler, 2003).

Chapitre IV □ La taline

A. Étude physiologique de la taline

La taline est une protéine multifonctionnelle du cytosquelette qui joue un rôle central dans le mécanisme d'adhérence cellulaire intégrine-dépendant. Elle possède aussi bien des sites d'interaction avec l'actine que des sites capables de lier la partie cytoplasmique des sous-unités □ des intégrines et intervient donc dans le lien qu'établissent les intégrines avec le cytosquelette d'actine (Calderwood & Ginsberg, 2003). De plus la taline est capable de moduler l'affinité des intégrines pour leurs ligands (Calderwood et al., 2002; Tadokoro et al., 2003). Cette protéine semble jouer un rôle clé dans le mécanisme d'adhérence cellulaire intégrine-dépendant. En effet, la taline colocalise avec des intégrines au niveau de sites d'adhérence MEC-cellule ainsi qu'au niveau de protrusions membranaires de cellules en migration (BurrIDGE & Connell, 1983; DePasquale & Izzard, 1991) et sa présence est requise pour l'assemblage des AF. Le rôle de la taline dans le mécanisme d'adhérence cellulaire a été étudié à l'aide d'anticorps anti-taline. La microinjection de ces anticorps dans des fibroblastes empêchait la formation d'AF et de fibres de stress (Nuckolls et al., 1992). Plus récemment, des approches génétiques ont permis de préciser le rôle de la taline dans différents types cellulaires et organismes. Ces études ont montré que l'inhibition de l'expression de la taline par des stratégies d'ARN antisens ou d'ARNsh (short hairpin) affectait un grand nombre de processus cellulaires comme l'assemblage des AF, la migration cellulaire, l'expression membranaire des intégrines ou l'activation des intégrines (Albiges-Rizo et al., 1995; Martel et al., 2001; Tadokoro et al., 2003). Des embryons de souris, délétés du gène de la taline, meurent au stade de la gastrulation et l'inactivation du gène de la taline dans des cellules souches embryonnaires murines montre que des cellules non-différenciées présentent des défauts au niveau de l'adhérence et de la migration et qu'elles sont incapables d'assembler des AF et des fibres de stress (Priddle et al., 1998; Monkley et al., 2000). Lorsque ces cellules étaient différenciées en cellules fibroblastoïdes, les effets observés étaient moins dramatiques, probablement à cause de la présence d'un

INTRODUCTION

deuxième gène de la taline, récemment identifié, dans les cellules de mammifères (Monkley et al., 2001). Finalement, l'inactivation du gène *rhea*, codant pour l'unique taline de la *Drosophila*, provoque un phénotype semblable à celui observé pour l'inactivation du gène de l'intégrine (α PS) (Brown et al., 2002).

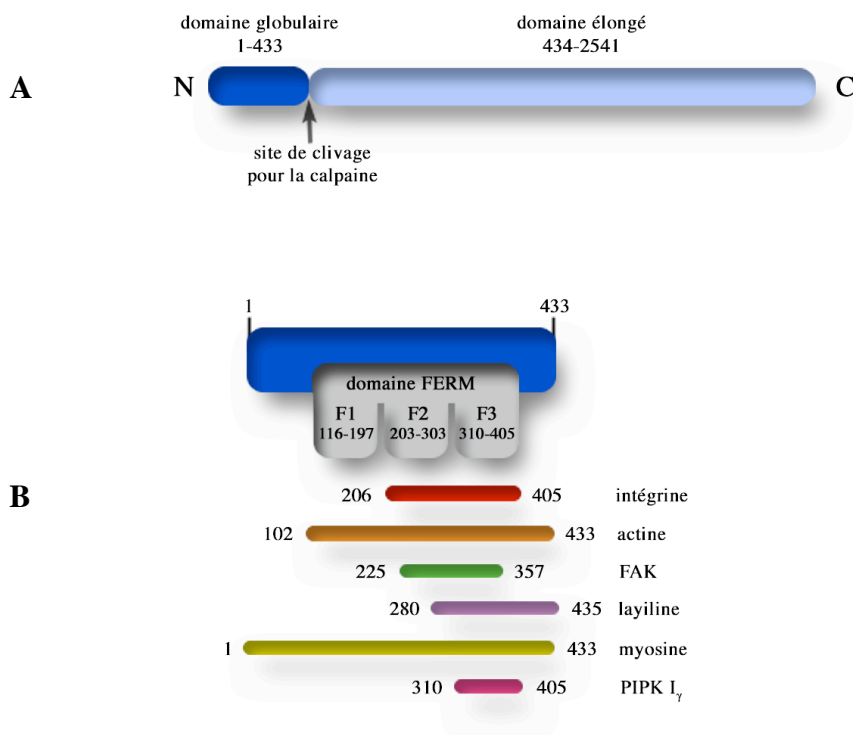


Figure 13: Représentation schématique de la taline

(A) La taline peut être clivée par la calpaine en un domaine globulaire et un domaine élongé. (B) Le domaine globulaire de la taline contient un domaine FERM comportant 3 sous-domaines (F1, F2 et F3). Sont représentés les différents sites d'interaction identifiés au niveau du domaine globulaire. Les nombres représentent les résidus de taline auxquels les différents sites ont été associés.

B. Structure de la taline

La taline est une protéine multifonctionnelle du cytosquelette, composée de 2541 acides aminés, d'une masse moléculaire de 270 kDa environ. Elle est constituée de deux domaines — un domaine globulaire N-terminal (aa 1-433) et un domaine élongé C-terminal (aa 434-2541). À la jonction de ces domaines, la taline possède un site de clivage pour la calpaine II, une protéase calcium-dépendante (Rees et al., 1990) (Figure 13A). L'action de la calpaine génère le domaine globulaire de 47 kDa et le domaine élongée de 190 kDa.

B.1. Le domaine globulaire de la taline

Le domaine globulaire de la taline contient un domaine FERM (Figure 13B), domaine protéique très conservé dans un grand nombre de protéines du cytosquelette (band4.1, ezrin, radixin, moesin) (Rees et al., 1990), qui interagit avec la partie cytoplasmique des sous-unités β des intégrines (Calderwood et al., 1999). De plus il contient trois sites potentiels d'ancrage à la membrane (Niggli et al., 1994; Seelig et al., 2000) ainsi que des sites d'interaction avec l'actine (Hemmings et al., 1996), la layiline (Borowsky & Hynes, 1998), la FAK (Chen et al., 1995), la myosine (Lin et al., 1998) et la PIPK I β (phosphatidylinositol phosphate kinase type I β) (Barsukov et al., 2003) (Figure 13B).

B.1.1. Le domaine FERM

Les domaines FERM en général interagissent souvent avec la partie cytoplasmique de récepteurs membranaires (Schultz et al., 1998; Girault et al., 1999; Mangeat et al., 1999). La structure cristalline des domaines FERM de la moesine, de la radixine et de la protéine band4.1 a révélé une organisation en trois sous-domaines F1, F2 et F3 (Figure 13B) (Hamada et al., 2000; Han et al., 2000; Pearson et al., 2000; Edwards & Keep, 2001). Le sous-domaine F3 adopte une structure de deux feuillets β , suivis

INTRODUCTION

d'une hélice α . Ce motif est également présent dans d'autres structures comme les domaines PTB (phosphotyrosine binding) ou les domaines PH. Les domaines PTB reconnaissent des motifs contenant une tyrosine phosphorylée et adoptant une structure en coude α au niveau de la partie cytoplasmique des récepteurs qu'ils fixent (Trub et al., 1995). Or les parties cytoplasmiques des sous-unités β des intégrines possèdent la séquence conservée NPXY, capable de former un tel motif en coude α . L'homologie de séquence du domaine FERM de la taline avec les domaines FERM d'autres protéines a permis d'établir un modèle structural suggérant que le sous-domaine F3 de la taline adopte également une structure semblable à celle des domaines PTB (Calderwood et al., 2002). Ce modèle a été confirmé par des études structurales et biochimiques montrant que les deux sous-domaines F2 et F3 de la taline fixent la partie cytoplasmique de β_3 et que cette interaction est rompue par la mutation $Y^{747}A$ du motif NPXY (Calderwood et al., 1999; Calderwood et al., 2002; Calderwood et al., 2003; Ulmer et al., 2003). Le principal rôle physiologique de l'interaction du domaine globulaire de la taline avec β_3 a été élucidé par la découverte que l'interaction du sous-domaine F3 avec la partie cytoplasmique de β_3 active l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Calderwood et al., 1999; Calderwood et al., 2002). Le mécanisme, par lequel la taline active l'intégrine, sera discuté plus bas dans cette partie (voir C.4.1. dans ce chapitre).

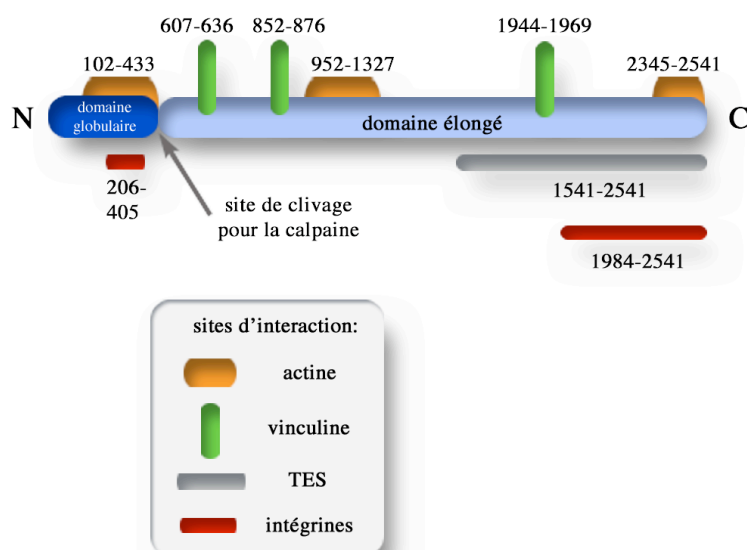


Figure 14: Sites d'interactions situés au niveau du domaine élongé de la taline

Le schéma représente la taline avec son domaine globulaire (bleu foncé) et son domaine élongé (bleu clair) ainsi que les sites d'interactions avec l'actine (orange), la vinculine (vert) la TES (gris) et les intégrines (rouge). Les nombres représentent les résidus de taline auxquels les différents sites ont été associés.

B.2. Le domaine élongé de la taline

Le domaine élongé C-terminal de la taline est principalement composé de nombreuses courtes séquences répétitives mais irrégulières (50 à 60 répétitions de 34 acides aminés environ), riches en alanines, qui s'organisent en hélices α (McLachlan et al., 1994). Ce domaine contient un site de dimérisation (Winkler et al., 1997), 3 sites d'interaction avec la vinculine (Gilmore et al., 1993), deux sites d'interaction avec l'actine (McCann & Craig, 1997), un site d'interaction pour les intégrines (Horwitz et al., 1986; Xing et al., 2001) ainsi qu'un site d'interaction avec la TES, une protéine des AF récemment identifiée et impliquée dans l'étalement cellulaire (Coutts et al., 2003) (Figure 14).

C. Rôle physiologique de la taline au niveau des adhérences focales

Avec ses nombreux sites d'interaction pour des intégrines, des protéines de signalisation et des protéines structurales des AF, la taline joue un rôle clé dans la formation et la régulation des adhérences focales. Pour le moment il n'existe pas encore de modèle cohérent de la fonction de la taline au niveau des AF. Néanmoins, certaines fonctions et interactions de la taline commencent à bien être caractérisées. La taline forme des homodimères antiparallèles (Goldmann et al., 1994a) et dans les cellules, la taline est présente sous deux formes \square une forme libre cytoplasmique et une forme associée à la membrane (Molony et al., 1987; Goldmann et al., 1994a). L'existence de ces deux pools a également été observée au niveau des plaquettes où la taline passe du cytoplasme à la membrane lors de l'activation plaquettaire (Beckerle et al., 1989; Escolar et al., 1995). Le clivage de la taline par la calpaine augmente l'affinité du domaine globulaire pour les intégrines (Yan et al., 2001) et ce clivage semble avoir lieu au niveau des AF et non au niveau du cytoplasme (Tranqui & Block, 1995), suggérant une fonction régulatrice de la calpaine dans l'interaction taline – intégrine.

C.1. L'Interaction de la taline avec la PIPK I_β

Comme pour le clivage par la calpaine, l'affinité de la taline pour les intégrines augmente en présence de PIP₂ (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate), qui se fixe probablement au niveau du domaine FERM (Pearson et al., 2000), suggérant qu'un changement conformationnel au niveau de la taline démasque au moins un des sites d'interaction avec les intégrines (Martel et al., 2001). Le domaine FERM de la taline peut interagir avec la PIPK I_β, une enzyme capable de générer du PIP₂ (Barsukov et al., 2003). Cette interaction pourrait donc entraîner la génération locale de PIP₂ au voisinage de la taline, menant à l'activation de la taline et favorisant son interaction avec l'intégrine. Néanmoins comme le site d'interaction avec la PIPK I_β et le site d'interaction avec l'intégrine au niveau du domaine FERM de la taline se chevauchent partiellement (Figure 13B), la taline ne peut fixer qu'une des deux protéines à la fois (Ling et al., 2003). Or comme la taline s'organise en homodimères antiparallèles, il est concevable qu'une molécule de taline fixe l'intégrine alors que l'autre fixe la PIPK I_β (Barsukov et al., 2003; Ling et al., 2003).

C.2. L'interaction de la taline avec l'actine

Très récemment, la force de la connexion entre la taline et le cytosquelette d'actine a pu être mesurée pour la première fois par l'utilisation de «pinces» laser en microscopie. En effet Jiang et al. (2003) ont mis au point une technique qui leur a permis de décoller des fibroblastes de souris, interagissant via l'intégrine α_vβ₃ avec une surface recouverte de peptide RGD cyclique. Ils ont pu mesurer la rupture d'une interaction correspondant à une force de 2 pN quand ils décollaient les cellules. Cette force n'était ni observée pour des cellules délétées du gène de la taline ou de l'intégrine β₃, ni pour des cellules exprimant une taline tronquée, délétée du site C-terminal d'interaction avec l'actine, prouvant que la force mesurée correspondait bien à une interaction taline – actine (Jiang et al., 2003).

Au total, la taline contient trois sites d'interaction avec l'actine, un au niveau du domaine globulaire (acides aminés 102 à 497) et deux dans le domaine élongé (aa 951

à 1327 et 2304 à 2463) (Hemmings et al., 1996; Bolton et al., 1997). L'interaction de ces trois sites avec l'F-actine a été étudiée par des expériences de co-sédimentation et leurs affinités ont été estimées à 5 μ M, 8 μ M et 17 μ M respectivement (Hemmings et al., 1996). Alors que Hemmings et al. (1996) ont trouvé que le site contenu dans le domaine globulaire exhibait la plus forte affinité (5 μ M), d'autres études ont uniquement observé une interaction du domaine élongé et non pas du domaine globulaire avec l'F-actine (Muguruma et al., 1995; Goldmann et al., 1997), voire une très faible interaction du domaine globulaire avec l'actine (Niggli et al., 1994). Néanmoins, une étude toute récente a confirmé l'interaction *in vivo* du domaine globulaire avec l'actine et a délimité le site d'interaction aux sous-domaines F2 et F3 du domaine FERM (Lee et al., 2004). De nombreuses études menées *in vitro* ont montré que la taline possède la capacité de promouvoir la nucléation de G-actine en F-actine ainsi que la connexion des filaments de F-actine entre eux (Kaufmann et al., 1991; Goldmann et al., 1994b; Muguruma et al., 1995; Zhang et al., 1996; Goldmann et al., 1999). Ces effets de la taline sur la dynamique des filaments d'actine sont uniquement attribués au domaine élongé (Niggli et al., 1994; Goldmann et al., 1997; Goldmann et al., 1999) et dépendent fortement de la température, des conditions ioniques et du pH (Goldmann et al., 1999; Schmidt et al., 1999).

Le site C-terminal d'interaction avec l'actine de la taline est le plus étudié et possède une forte homologie de séquence avec plusieurs protéines d'interaction avec l'actine comme la protéine de levure Sla2p, impliquée dans l'assemblage du cytosquelette (Holtzman et al., 1993), les protéines Hip1 (Wanker et al., 1997) et mHip1R (Seki et al., 1998), homologues de Sla2 chez les mammifères, ou encore la protéine Sla2 putative de nématode (Wilson et al., 1994). La microinjection d'un peptide comportant ce domaine de la taline a révélé une localisation le long des filaments d'actine (Hemmings et al., 1996). Depuis, différentes études se sont servies de cette séquence de taline, fusionnée à des protéines fluorescentes comme la GFP, pour étudier la dynamique des filaments d'actine *in vivo* (Kost et al., 1998; Weber et al., 2002). L'analyse de cette séquence conservée au niveau des différentes protéines d'interaction avec l'actine a révélé un module de 4 blocs répétitifs. Ce module est appelé I/LWEQ d'après les résidus conservés initiaux de chaque bloc (McCann & Craig, 1997) et est responsable de la connexion au cytosquelette des différentes protéines (McCann & Craig, 1999). Pour la taline, ce module s'étend sur les acides

INTRODUCTION

aminés 2346 à 2530 et pour Sla2, la mutation d'un seul résidu conservé de ce module (R⁹⁵⁸G) suffit pour rompre l'interaction avec l'actine (McCann & Craig, 1997).

C.3. L'interaction de la taline avec la vinculine

Le domaine élongé de la taline contient 3 sites d'interaction avec la vinculine (résidus 607-636, 852-879 et 1944-1969), correspondant chacun à un motif répétitif, riche en alanine (voir B.2.) (Gilmore et al., 1993; McLachlan et al., 1994; Hemmings et al., 1996; Bass et al., 1999; Papagrigoriou et al., 2004). Récemment la structure cristalline du premier de ces trois sites a été réalisée, révélant que le site d'interaction au niveau de la taline est masqué et suggérant la présence d'un mécanisme d'activation (Papagrigoriou et al., 2004). Comme les trois sites d'interaction avec la vinculine correspondent chacun à un motif répétitif, riche en alanine, et comme les trois sites interagissent avec la même séquence (acides aminés 1-133) du domaine globulaire de la vinculine (Gilmore et al., 1993; Bass et al., 1999; Bass et al., 2002), il est probable que le mécanisme d'interaction observé pour le premier site soit semblable à celui des deux autres sites.

La vinculine est une protéine des AF qui peut interagir avec un grand nombre de protéines comme l' α -actinine, l' α -caténine, la VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein), la vinexine, la ponsine, la paxilline, l'actine et la taline (Critchley, 2000). L'inactivation du gène de la vinculine dans des cellules embryonnaires F9 de carcinome résulte d'un côté dans une adhérence et un étalement cellulaire réduit (Volberg et al., 1995; Xu et al., 1998) mais d'un autre côté dans la phosphorylation excessive de protéines comme la FAK, la p130Cas ou la paxilline, importantes pour la migration cellulaire (Xu et al., 1998). Ces observations suggèrent que la vinculine assure un rôle fonctionnel de régulateur négatif de la mobilité cellulaire, ce qui pourrait expliquer son rôle de suppresseur de tumeur dans certains systèmes. Au niveau structural, beaucoup de parallèles existent entre la vinculine et la taline. La vinculine est constituée d'un domaine globulaire N-terminal et d'un domaine élongé C-terminal. Une forte interaction intramoléculaire (Kd 50 nM) entre les deux domaines, impliquant les résidus 1013 à 1043 du domaine élongé (Johnson & Craig, 1994; Bakolitsa et al., 1999; Miller et al., 2001), contraint la vinculine dans une forme

inactive, masquant les sites d'interaction avec la taline, l' β -actinine et l' β -caténine au niveau du domaine globulaire ainsi que les sites pour l'F-actine au niveau du domaine élongé (Johnson & Craig, 1994; McGregor et al., 1994; Johnson & Craig, 1995; Gilmore & Burridge, 1996). Ces sites cryptiques peuvent être exposés suite à l'interaction du domaine élongé de la taline avec du PIP₂ (Gilmore & Burridge, 1996; Weekes et al., 1996; Steimle et al., 1999) ou avec la taline (Johnson & Craig, 1994; Bass et al., 2002). Récemment, des études structurales et cristallographiques ont permis d'élucider le mécanisme d'activation de la vinculine par la taline (Izard et al., 2004; Izard & Vorrhein, 2004), montrant que l'exposition des sites cryptiques au niveau de la vinculine ne résulte pas d'une simple libération stérique mais d'un réarrangement conformationnel complet des hélices α constituant le domaine globulaire.

Dans l'ensemble ces observations suggèrent une régulation complexe de l'interaction entre la taline et la vinculine au niveau des deux protéines. Ainsi l'interaction d'une molécule de taline avec trois molécules de vinculine pourrait permettre une amplification de signaux en provenance des intégrines, résultant dans des changements rapides au niveau du cytosquelette d'actine

C.4. L'interaction de la taline avec les intégrines

C.4.1. Le domaine globulaire de la taline active les intégrines

La première preuve de l'implication de la taline dans le mécanisme d'activation des intégrines était apportée par une étude de surexpression de la taline (Calderwood et al., 1999). Pour le moment, seule l'activation des intégrines β_2 et β_3 par la taline a été démontrée (Kim et al., 2003; Tadokoro et al., 2003) mais comme la taline interagit avec la plupart des sous-unités α des intégrines (α_{1A} , α_{1D} , α_2 , α_3 , α_5 et α_7) (Calderwood et al., 2000; Critchley, 2000) on peut supposer que l'activation des intégrines par la taline constitue un mécanisme plus général. Calderwood et al. (2002) ont montré que la surexpression du sous-domaine F3 du domaine FERM de la taline suffisait pour activer l'intégrine $\alpha_{1b}\beta_3$ et ont suggéré que l'interaction de F3 avec la partie

INTRODUCTION

cytoplasmique ressemblait à l'interaction d'un domaine PTB (structure adoptée par F3) avec un motif en coude \square (structure adoptée par le motif NPXY de \square_3). Cette hypothèse a été confirmée par la structure cristalline de F3 en interaction avec les acides aminés 739 à 750 de la partie cytoplasmique de \square_3 (Garcia-Alvarez et al., 2003). En effet, le motif $^{744}\text{NPLY}^{747}$ forme un coude \square et la Y^{747} s'insère dans une poche acide et hydrophobe au niveau de F3. En plus du résidu Y^{747} , le résidu W^{739} (en position -8 par rapport à Y^{747}) est en contact étroit avec F3 et semble jouer un rôle important dans cette interaction. La mutation de ce résidu W^{739} , de résidus importants à la formation du coude \square au niveau de \square_3 ou de résidus de taline en contact avec \square_3 rompt l'interaction de F3 avec la partie cytoplasmique de \square_3 et inhibe l'activation de l'intégrine (Garcia-Alvarez et al., 2003; Tadokoro et al., 2003).

C.4.1.1. Le mécanisme d'activation

Le mécanisme d'activation des intégrines par la dissociation de leurs parties cytoplasmiques a été discutée en détail dans le chapitre II. Comme la taline active les intégrines, son interaction avec la partie cytoplasmique de la sous-unité \square devrait entraîner la séparation des parties cytoplasmiques. L'étude par RMN (nuclear magnetic resonance) de la partie cytoplasmique de \square_3 a montré que l'interaction du sous-domaine F3 entraînait non seulement des perturbations du spectre au niveau du motif NPLY mais aussi au niveau juxtamembranaire (Ulmer et al., 2003). De plus aucune interaction entre les parties juxtamembranaires de \square_{nb} et \square_3 n'a pu être détectée en présence du domaine globulaire de la taline (Vinogradova et al., 2002). Ces observations semblent confirmer que l'interaction du domaine globulaire de la taline avec \square_3 est responsable de la séparation des parties cytoplasmiques, soit par une interaction directe avec des résidus proches de la membrane (Patil et al., 1999), soit par des changements conformationnels induits par l'interaction F3 – \square_3 (NPLY).

C.4.1.2. Régulation de l'activation

C.4.1.2.1. La PIPKI β et le PIP $_2$

Le domaine globulaire de la taline a une affinité six fois plus forte pour β_3 que la taline intacte, suggérant que le site d'interaction avec les intégrines est masqué au niveau du domaine FERM de la taline intacte (Yan et al., 2001). Ce mécanisme a été observé pour de nombreuses protéines comportant des domaines FERM, où une interaction du domaine C-terminal avec le domaine FERM N-terminal masque des sites d'interaction (Pearson et al., 2000). L'interaction de PIP $_2$ avec la taline induit un changement conformationnel qui expose le site d'interaction avec les intégrines au niveau du domaine FERM et augmente l'affinité pour β_1 (Martel et al., 2001). Le domaine FERM de la taline interagit avec la PIPKI β , une enzyme produisant du PIP $_2$ (Barsukov et al., 2003). Ainsi la taline peut stimuler la production locale de PIP $_2$, favorisant son interaction avec l'intégrine. D'un autre côté la PIPKI β et la partie cytoplasmique des sous-unités β entrent en compétition pour l'interaction avec le domaine FERM de la taline (Barsukov et al., 2003). Ceci suggère que l'interaction de la taline avec la PIPKI β peut réguler l'association de la taline avec la sous-unité β (et par conséquent l'activation de l'intégrine) aussi bien de manière positive que de manière négative.

C.4.1.2.2. La calpaine

Le clivage de la taline par la calpaine est un autre mécanisme permettant l'exposition du site d'interaction masqué au niveau du domaine FERM. Une étude d'interaction protéine-protéine par SPR (surface plasmon resonance) a révélé qu'après clivage par la calpaine, les deux domaines isolés de la taline possèdent une affinité beaucoup plus forte (~ 16 fois) pour β_3 que la taline intacte non clivée (Yan et al., 2001). Une étude récente a confirmé que le clivage de la taline par la calpaine a lieu *in vivo* en montrant que l'inhibition de l'expression de la calpaine dans des fibroblastes de souris résulte

INTRODUCTION

dans une diminution du clivage de la taline en ses domaines globulaires et élongés et dans une persistance prolongée de la taline entière dans les AF (Franco et al., 2004). Ces résultats suggèrent que le clivage de la taline par la calpaine est nécessaire à la désagrégation des AF.

En plus de la taline, la calpaine peut cliver de nombreux autres substrats, présents au niveau des AF, comme la FAK, Src ou les parties cytoplasmiques des sous-unités β des intégrines (Du et al., 1995; Ilic et al., 1995; Fincham & Frame, 1998; Pfaff et al., 1999; Webb et al., 2004), suggérant un rôle complexe de la calpaine dans les mécanismes de régulation des AF. En effet, alors que le clivage des parties cytoplasmiques des sous-unités β au niveau des deux motifs NXXY C-terminaux (Pfaff et al., 1999) pourrait être un mécanisme de régulation négative de l'activation des intégrines, le clivage de la taline pourrait favoriser l'activation en augmentant l'affinité du domaine globulaire pour la sous-unité β des intégrines.

C.4.1.2.3. La phosphorylation

La phosphorylation de la taline ou des parties cytoplasmiques des intégrines constitue un autre mécanisme de régulation potentiel. De nombreuses études ont montré la phosphorylation de la taline, mais le rôle de ces modifications n'a jamais été élucidé. Par contre, la phosphorylation du résidu tyrosine au niveau du motif NPXY de la partie cytoplasmique des sous-unités β inhibe l'interaction avec la taline (Tapley et al., 1989) alors que des parties cytoplasmiques non phosphorylées interagissent normalement (Calderwood et al., 1999; Calderwood et al., 2002). Ces résultats sont confirmés par l'observation que la Y⁷⁴⁷ de β_3 occupe une poche non-chargée au niveau de F3 (Garcia-Alvarez et al., 2003), qui serait difficilement accessible à un résidu phosphorylé et par le fait que la sous-unité β_2 des intégrines interagit avec la taline, malgré l'absence de tyrosine au niveau de sa partie cytoplasmique (Sampath et al., 1998). De plus la phosphorylation par Src du motif NPXY des sous-unités β diminue l'adhérence cellulaire et joue un rôle important dans la migration cellulaire (Johansson et al., 1994; Sakai et al., 2001; Datta et al., 2002). Ces résultats montrent que la phosphorylation des parties cytoplasmiques des intégrines constitue probablement un autre mécanisme de régulation de l'activation des intégrines.

C.4.1.2.4. Autres protéines

Finalement d'autres protéines cytoplasmiques peuvent entrer en compétition avec la taline pour interagir avec les parties cytoplasmiques des intégrines. Ainsi la protéine ICAP-1 β , une petite protéine de 200 acides aminés environ possédant un grand nombre de résidus potentiellement phosphorylables (Chang et al., 1997; Zhang & Hemler, 1999), interagit via son domaine PTB avec le motif NPXY de β_{1A} et inhibe l'association de β_{1A} avec la taline (Chang et al., 2002; Bouvard et al., 2003). Degani et al. (2002) ont montré que ICAP-1 interagit avec les GTPases Rho Cdc42 et Rac1 pour les maintenir dans un état inactif et ont suggéré que l'interaction de ICAP-1 avec β_1 pourrait libérer Rac1 et Cdc42, induisant ainsi l'étalement cellulaire (Degani et al., 2002). Bouvard et al. (2003) par contre ont montré que ICAP-1 induit le désassemblage d'AF, suggérant une compétition de ICAP-1 avec la taline pour l'interaction avec l'intégrine et un rôle régulateur négatif de ICAP-1 pour l'avidité de l'intégrine (Bouvard et al., 2003). Même si l'interaction de ICAP-1 avec β_1 implique la séquence NPXY conservée des sous-unités β des intégrines (Chang et al., 1997), ce mécanisme semble spécifique des intégrines β_1 (Zhang & Hemler, 1999). C'est pourquoi le rôle de ICAP-1 dans la signalisation intégrine-dépendante ne sera pas discuté d'avantage ici.

C.4.2. Interaction du domaine élongé de la taline avec les intégrines

A la première découverte d'une interaction entre la taline et une intégrine, le site d'interaction a été attribué au domaine élongé C-terminal de la taline (Horwitz et al., 1986). Depuis, ce site n'a plus fait l'objet d'études approfondies visant à élucider son rôle au niveau des nombreuses interactions complexes des AF. Seul Xing et al. (2001 276) ont montré par une approche *in vitro* que ce site d'interaction est contenu dans les 558 acides aminés C-terminaux de la taline mais le rôle physiologique et l'importance *in vivo* de cette interaction restent inconnus. Nous avons donc choisi d'étudier cette interaction du domaine élongé de la taline avec les intégrines, de

INTRODUCTION

délimiter, dans un premier temps, le site d'interaction au niveau de la taline et de mettre en évidence, dans un deuxième temps, l'importance *in vivo* ainsi que le rôle fonctionnel de cette interaction.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

Au terme de cette introduction, il apparaît que la taline est une protéine essentielle des AF. Trois sites d'interaction avec l'actine et deux sites d'interaction avec les intégrines lui permettent de connecter les intégrines au cytosquelette d'actine et de nombreux autres sites d'interaction semblent lui attribuer un rôle d'échafaudage pour l'architecture des AF. En effet elle recrute aussi bien des protéines structurales comme la vinculine que des protéines de signalisation comme la FAK ou la PIPK I β . L'interaction du domaine globulaire de la taline avec la partie cytoplasmique des sous-unités β des intégrines et le rôle de cette interaction dans la régulation de l'affinité des intégrines a largement été étudiée (Calderwood, 2004b). Le site d'interaction avec les intégrines au niveau du domaine élongé de la taline par contre, alors qu'il était le premier à être identifié (Horwitz et al., 1986), a été très peu étudié. Afin de mieux comprendre les liens structuraux qu'établit la taline au niveau des AF, nous avons décidé d'étudier ce site d'interaction. Dans un premier temps, nous avons souhaité confirmer cette interaction *in vitro* à l'aide de protéines purifiées à partir de plaquettes sanguines. Dans le but de pouvoir étudier le rôle physiologique de cette interaction dans un système cellulaire, nous nous sommes fixé, dans un deuxième temps, l'objectif de délimiter le plus précisément possible le site d'interaction et de voir si cette interaction est d'une importance physiologique, c'est-à-dire si elle a effectivement lieu *in vivo*, au sein de la cellule. Finalement, après avoir identifié précisément le site d'interaction et démontré son importance physiologique, nous avons abordé, dans un troisième temps, l'étude de son rôle fonctionnel dans les mécanismes d'adhérence et de migration cellulaire.

RESULTATS

RESULTATS

Chapitre I

Étude de l'interaction de la taline avec la partie cytoplasmique de la sous-unité β_3 des intégrines

Alors que l'interaction du domaine globulaire de la taline avec les intégrines a été étudiée en détail (Calderwood et al., 1999; Calderwood et al., 2002), le deuxième site d'interaction avec les intégrines, situé au niveau du domaine élongé de la taline, était le premier à être identifié mais a été très peu étudié. Jusqu'à présent cette interaction a seulement été mise en évidence *in vitro* (Horwitz et al., 1986; Xing et al., 2001) et le site d'interaction a été attribué à un fragment de taline contenant les 558 résidus C-terminaux du domaine élongé (Xing et al., 2001). Alors que Xing et al. (2001) ont utilisé pour leurs expériences d'interaction l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ entière, purifiée à partir de concentrés plaquettaires par chromatographie d'affinité sur résine RGD, Horwitz et al. (1986) ont montré que le domaine élongé interagit avec la sous-unité β_1 des intégrines, suggérant que l'interaction du domaine élongé avec $\alpha_{IIb}\beta_3$ se fait au niveau de la sous-unité β_3 .

Pour confirmer que le domaine élongé de la taline interagit bien avec la partie cytoplasmique de la sous-unité β_3 de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, nous avons, dans un premier temps, étudié l'interaction *in vitro* de la taline entière et de son domaine élongé, purifiés à partir de lysat plaquettaire, avec une partie cytoplasmique recombinante de β_3 , fusionnée à la GST (glutathion S-transférase). Dans un deuxième temps, nous avons essayé, par une approche bioinformatique, d'identifier au niveau du domaine élongé de la taline des domaines et séquences fortement conservées, pouvant potentiellement constituer des domaines fonctionnels, voir un site d'interaction avec l'intégrine.

RESULTATS

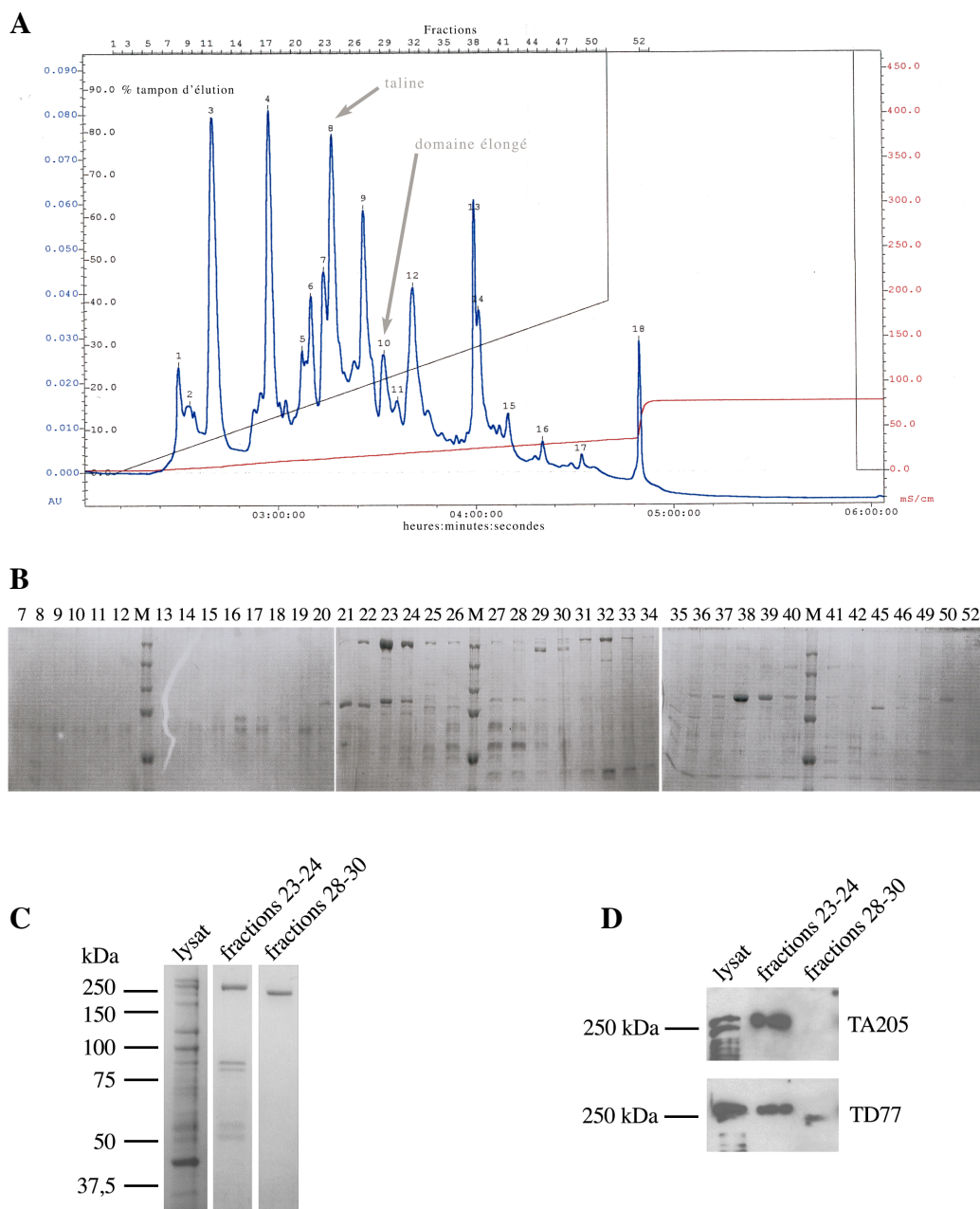


Figure 15: Purification de la taline humaine entière et de son domaine élongé à partir de plaquettes sanguines

(A) Chromatogramme de la purification de la taline humaine et son domaine élongé par chromatographie sur colonne échangeuse d'anions. Un gradient d'éluion de NaCl de 10 à 400 mM a été utilisé (ligne noire). (B) La taline et son domaine élongé ont été identifiés dans les fractions éluées 23 à 24 et 28 à 30 respectivement par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Le marqueur de poids moléculaire est indiqué (M). Ces fractions ont été regroupées et analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (C) et par Western blot (D) à l'aide d'un anticorps dirigé contre la tête globulaire de la taline (TA205) et d'un anticorps dirigé contre le domaine élongé (TD77).

A. Étude *in vitro* de l'interaction du domaine élongé de la taline avec α_3

A.1. Purification de la taline humaine entière et de son domaine élongé à partir de plaquettes sanguines

La taline humaine et son domaine élongé ont été purifiés selon un protocole modifié d'après Turner & Burridge (1989) à partir de concentrés plaquettaires périmés, mis à notre disposition par le Dr J.-Cl. Faber du Centre de Transfusion Sanguine de la Croix Rouge Luxembourgeoise (Turner & Burridge, 1989). Après plusieurs lavages, les plaquettes ont été lysées comme décrit dans l'annexe «Matériels et Méthodes». Le lysat plaquettaire a été incubé sur une colonne échangeuse d'anions (UNO Q12, Sigma) et les protéines ont été éluées à l'aide d'un gradient de NaCl de 10 à 400 mM et collectées en 50 fractions de 3 mL (Figure 15A). Afin d'identifier les fractions contenant la taline entière ou le domaine élongé, toutes les fractions ont été analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide de 8% (Figure 15B). Des bandes correspondant à la taline entière (270 kDa) et au domaine élongé (190 kDa) ont été identifiées dans les fractions 23 à 24 et 28 à 30 respectivement. Ces fractions ont été regroupées et analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (Figure 15C) et par Western blot (Figure 15D) à l'aide d'anticorps dirigés contre le domaine globulaire (TA205) et le domaine élongé (TD77) de la taline. La figure 15D montre que la protéine isolée dans les fractions 23 et 24 est reconnue par les deux anticorps et correspond donc à la taline entière. La protéine purifiée dans les fractions 28 à 30 par contre est uniquement reconnue par l'anticorps TD77 et non pas par l'anticorps TA205 et correspond au domaine élongé de la taline.

Dans les plaquettes, la taline est clivée au cours de l'activation plaquettaire par la calpaine et une grande partie de la taline est également clivée dans les plaquettes périmées, ce qui explique la fraction importante de taline clivée dans notre purification.

RESULTATS

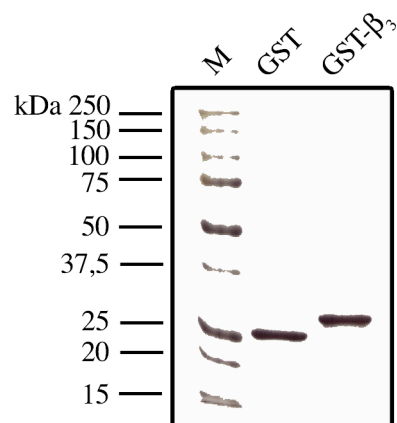


Figure 16: Purification de GST et GST-β₃

Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide de GST et GST-β₃ après purification à partir de lysats bactériens par chromatographie d'affinité sur glutathion-Sépharose 4B. M \square marqueur de poids moléculaire.

A.2. Production et purification de la partie cytoplasmique recombinante de β_3 fusionnée à GST (GST- β_3)

Pour la production de GST- β_3 nous avons utilisé un vecteur pGEX-4T-2, dans lequel de l'ADNc codant pour la partie cytoplasmique de β_3 a été inséré (Vallar et al., 1999). Des bactéries *Escherichia coli* BL21 (DE3) ont été transformées avec ce vecteur et après induction, les bactéries ont été lysées comme décrit dans l'annexe «Matériels et Méthodes». La protéine GST- β_3 recombinante a alors été purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne de glutathion-Sépharose 4B. La GST seule, servant de contrôle négatif lors des expériences d'interaction, a été purifiée de la même manière à partir de bactéries transformées avec le vecteur pGEX-4T-2. Après purification, la GST- β_3 et la GST ont été analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (Figure 16).

A.3. Étude *in vitro* de l'interaction de la taline et de son domaine élongé avec la partie cytoplasmique recombinante GST- β_3

Pour démontrer l'interaction du domaine élongé de la taline avec la partie cytoplasmique de β_3 , nous avons choisi la technique ELISA (enzyme linked immunosorbant assay). La taline (4 μ g/mL) ou son domaine élongé (3 μ g/mL) ont été immobilisés dans des plaques de 96 puits et après saturation des plaques avec la BSA (bovine serum albumin), les protéines immobilisées ont été incubées pendant 2 heures à 37°C en présence de concentrations croissantes (0,1 à 200 μ g/mL) de GST- β_3 ou de GST seule, servant de contrôle négatif. Après plusieurs lavages, la quantité de GST- β_3 (ou GST seule) retenue a été révélée à l'aide d'un anticorps primaire de lapin, dirigé contre la GST, et d'un anticorps secondaire, dirigé contre les IgG de lapin et couplé à la peroxydase.

RESULTATS

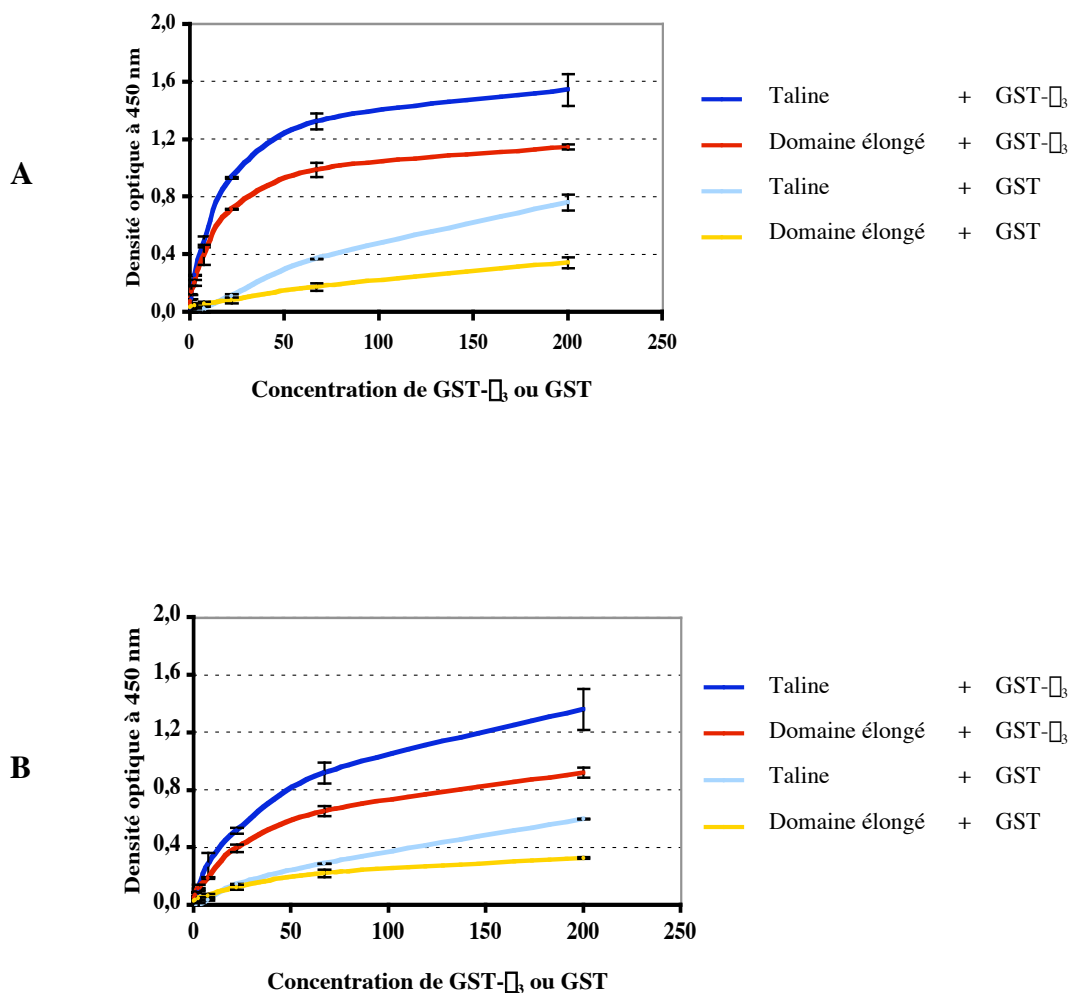


Figure 17: Étude *in vitro* de l'interaction de la taline et de son domaine élongé avec la partie cytoplasmique recombinante GST- β_3

(A) L'interaction de la taline (bleu foncé) et du domaine élongé (rouge) avec GST- β_3 a été étudié par ELISA en plaque de 96 puits. La GST seule (bleu clair et jaune) a servi comme contrôle négatif. (B) Pour mettre en évidence un éventuel effet de PIP₂ sur l'interaction, la même expérience a été réalisée après préincubation de la taline ou de son domaine élongé en présence de PIP₂.

La figure 17A montre que GST- β_3 interagit de manière concentration dépendante avec le domaine élongé de la taline (rouge). La spécificité de cette interaction est démontrée par le contrôle GST (jaune), qui n'est pas retenue par le domaine élongé, confirmant la présence d'un site d'interaction avec β_3 au niveau du domaine élongé de la taline. La faible interaction non spécifique de la taline entière avec la GST seule pourrait être due à des interactions hydrophobes avec les sites d'insertion dans la membrane, présents au niveau du domaine globulaire de la taline (Niggli et al., 1994; Seelig et al., 2000).

Comme le PIP₂ peut augmenter l'affinité de la taline pour les intégrines en induisant un changement conformationnel (Martel et al., 2001; Yan et al., 2001), nous avons répété l'expérience en préincubant la taline (et son domaine élongé) avec du PIP₂. Néanmoins, la présence de PIP₂ n'avait aucun effet sur les interactions observées (Figure 17B), suggérant que l'immobilisation de la taline dans les puits induit des changements conformationnels semblables à ceux qui sont provoqués par le PIP₂.

B. Étude de la séquence protéique de la taline par une approche bioinformatique

B.1. Recherche de domaines fonctionnels au niveau de la taline humaine

Dans l'espoir d'identifier éventuellement des nouveaux domaines fonctionnels au niveau de la taline, nous avons réalisé un Blastp (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> matrice Γ BLOSUM62), comparant la séquence de la taline1 humaine à toutes les séquences protéiques connues, déposées dans plusieurs banques de données (swissprot, pat, yeast, ecoli, pdb, Drosophila genome, month). Lors d'un BLASTp, une valeur d'alignement est calculée pour chaque protéine identifiée, indiquant le niveau d'homologie entre la protéine correspondante et la protéine de référence (la taline1 humaine). Plus la valeur d'alignement est élevée, plus l'homologie entre les deux protéines est élevée.

RESULTATS

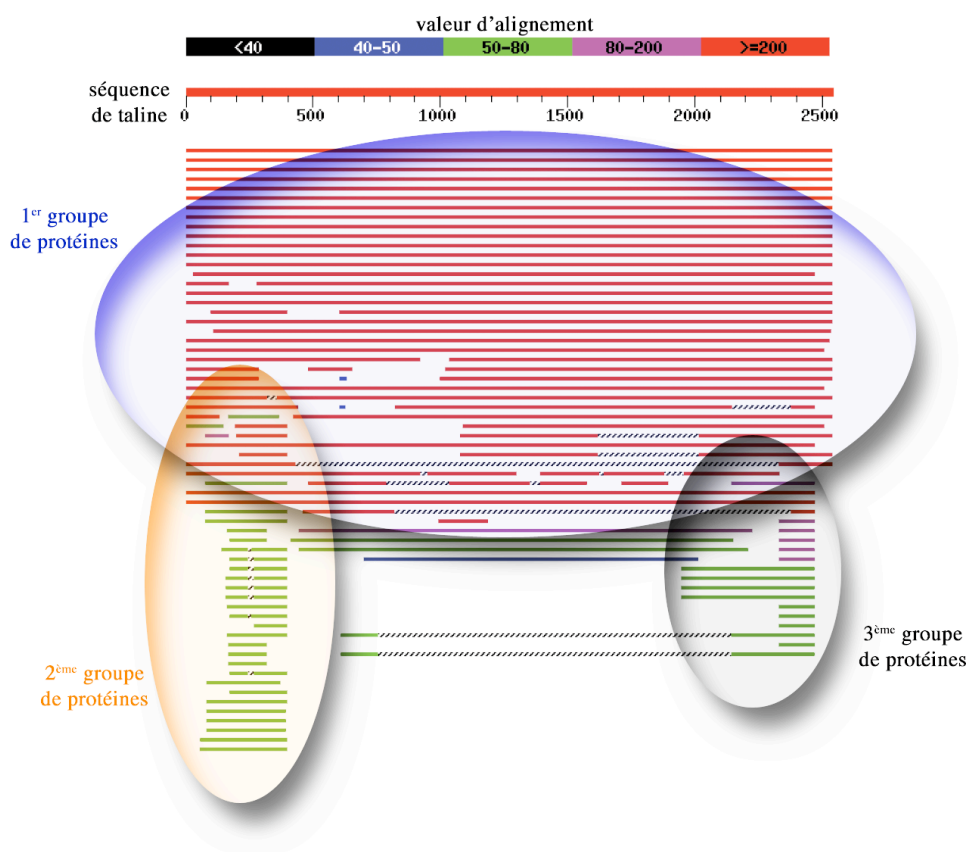


Figure 18: Recherche de domaines fonctionnels au niveau de la taline1 humaine

La taline1 humaine a été comparée par un BLASTp à toutes les séquences de protéines déposées dans différentes banques de données. Chaque ligne représente la séquence d'une protéine homologue à la taline. La couleur des différentes lignes indique la valeur d'alignement (voir barre des couleurs). Trois groupes de protéines ont ainsi été identifiés. Le premier groupe (ovale bleu) est composé de protéines taline de différentes espèces. Le deuxième groupe (ovale orange) contient des protéines possédant un domaine FERM, homologue au domaine FERM de la tête globulaire de la taline. Le troisième groupe (ovale noir) contient des protéines d'interaction avec l'actine, possédant une homologie avec le site C-terminal d'interaction avec l'actine de la taline.

Cette approche nous a permis d'identifier 3 groupes de protéines possédant à un certain niveau de leur séquence une homologie avec la taline (Figure 18). Le premier groupe (oval bleu) est constitué de protéines taline1 ou taline 2 de nombreux organismes différents (souris, rat, poulet, anophèle, drosophile ou différentes levures). Les valeurs d'alignement élevées, observées pour ce groupe de protéines, soulignent la forte conservation de la séquence de la taline à travers les différentes espèces. Le deuxième groupe (oval orange) comporte des protéines possédant un domaine FERM comme la band4.1, la radixine ou la moesine et l'homologie entre la taline et ces protéines se limite essentiellement à la séquence de leurs domaines FERM. Finalement, le troisième groupe de protéines identifiées (oval noir) comporte des protéines d'interaction avec l'actine comme la Hip1 ou la Sla2p ainsi que leurs analogues chez différents organismes. L'homologie de ces protéines avec la taline se limite essentiellement à leurs domaines C-terminaux d'interaction avec l'actine. Même si cette approche nous a permis de confirmer la présence de deux domaines connus (le domaine FERM et le domaine C-terminal d'interaction avec l'actine), elle ne nous a pas permis d'identifier de nouveaux domaines fonctionnels potentiels au niveau de la taline.

B.2. Étude de l'homologie de séquence entre 7 molécules de taline de 5 espèces différentes au niveau des 558 résidus C-terminaux

Les 558 acides aminés C-terminaux de la taline contiennent un site d'interaction avec l'intégrine α_3 (Xing et al., 2001). Pour mettre en évidence des séquences hautement conservées à travers différentes espèces, pouvant potentiellement constituer des sites d'interaction ou domaines fonctionnels conservés au cours de l'évolution, nous avons aligné les 558 résidus C-terminaux de 7 molécules de taline : la taline1 et 2 humaine, la taline1 et 2 de souris, la taline de poulet ainsi que la taline de la drosophile et de *C. elegans* (Figure 19). Par la suite nous avons calculé le pourcentage d'identité des différentes molécules de taline comparées à la taline1 humaine.

RESULTATS

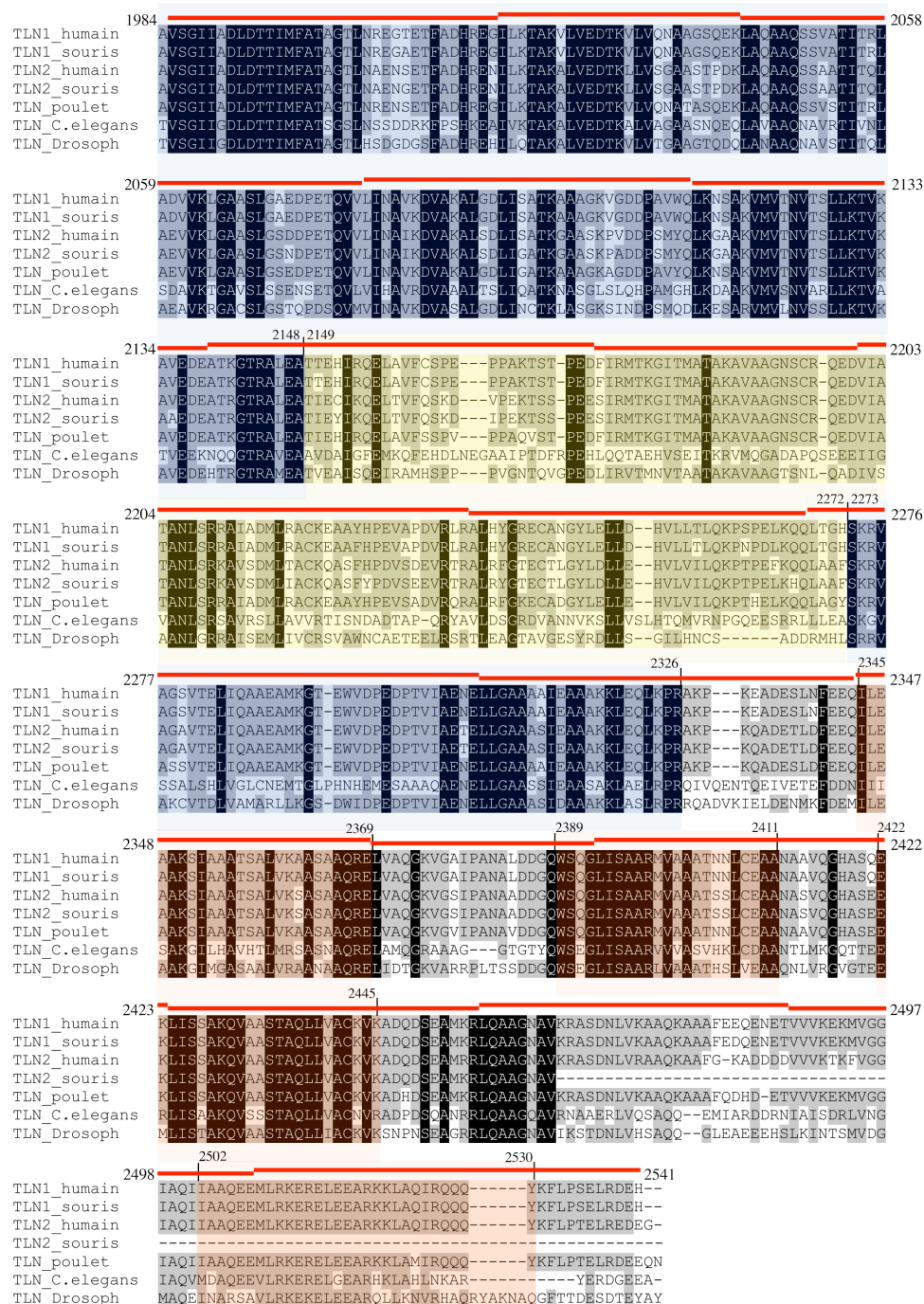


Figure 19: Étude de l'homologie de séquence entre 7 molécules de taline de 5 espèces différentes au niveau des 558 résidus C-terminaux

Les 558 résidus C-terminaux de 7 molécules de taline différentes ont été alignées la taline1 et taline2 humaine (TLN1_humain, TLN2_humain), la taline1 et taline2 murine (TLN1_souris, TLN2_souris), la taline de poulet (TLN_poulet), la taline de *C. elegans* (TLN_C.elegans) et la taline de la drosophile (TLN_Drosoph). Les 4 blocs I/LWEQ conservés du site d'interaction avec l'actine (résidus 2345 à 2369, 2389 à 2411, 2422 à 2445 et 2502 à 2530) sont relevés en orange. La ligne discontinue rouge représente les motifs répétitifs, riches en alanine, identifiés par McLachlan et al. (1994) et chaque saut de ligne marque le début d'un nouveau motif. L'analyse de l'alignement de séquences a permis d'identifier deux régions assez conservées (bleu, résidus 1984 à 2148 et 2273 à 2329) et une région relativement peu conservée (jaune, résidus 2149 à 2272).

	% d'identité avec la taline1 humaine
TLN1 souris	98,6
TLN2 humain	76,1
TLN2 souris	70,3
TLN poulet	89,0
TLN C. elegans	37,9
TLN Drosoph	42,7

Tableau 3: Pourcentage d'identité de différentes molécules de taline avec la taline1 humaine

Le tableau 3 montre que toutes les talines des mammifères sont très conservées (avec un pourcentage d'identité supérieur à 70 %) à travers l'évolution, alors que les talines de la Drosophile et de C. elegans diffèrent un peu plus de la taline humaine (42,7 et 37,9 % d'identité respectivement). Pour mettre en évidence des régions particulièrement conservées, pouvant avoir un rôle fonctionnel, nous avons donc focalisé sur la comparaison de la taline1 humaine avec celles de la drosophile et de C. elegans. Dans un premier temps, nous avons calculé les pourcentages d'identité pour les 4 blocs I/LWEQ (Figure 19), identifiés au niveau du site C-terminal d'interaction avec l'actine et responsables de l'interaction avec l'actine (McCann & Craig, 1997). Les pourcentages de 62,4 et 71,3 pour C. elegans et la drosophile respectivement (Tableau 4) montrent que le domaine fonctionnel d'interaction avec l'actine est particulièrement conservé, comparé à la totalité de la séquence de la taline (37,9 et 42,7 %) ou aux 558 résidus C-terminaux de la taline (44,8 et 38,4 %). Cette observation suggère que le site d'interaction avec les intégrines, contenu dans les 558 résidus C-terminaux de la taline, devrait lui aussi être plus conservé que la séquence qui l'entoure. L'analyse de l'alignement de séquences (Figure 19) nous a permis de mettre en évidence deux régions particulièrement conservées au niveau des 558 résidus C-terminaux de la taline: i) la séquence des acides aminés 1984 à 2148 (59,4 et 69,1 % d'identité entre la taline humaine et celle de C. elegans ou celle de la drosophile) et ii) la séquence des acides aminés 2273 à 2329 (44,6 et 69,6 % d'identité entre la taline humaine et celle de C. elegans ou celle de la drosophile).

RESULTATS

La séquence de taline comprise entre ces deux régions conservées (résidus 2149 à 2272) est beaucoup moins conservée entre humains et *C. elegans* ou la drosophile (22,1 et 35,9 % d'identité respectivement) (Tableau 4). L'ensemble de ces résultats pourrait suggérer que le site d'interaction avec les intégrines du domaine élongé de la taline soit plutôt localisé dans une des deux régions conservées (résidus 1984 à 2148 ou 2273 à 2329) que dans la séquence moins conservée des résidus 2149 à 2272.

Séquence de la taline1 humaine	% d'identité avec la taline de <i>C. elegans</i>	% d'identité avec la taline de la drosophile
Taline entière (1-2541)	37,9	42,7
558 résidus C-terminaux (1984-2541)	44,8	38,4
4 blocs I/LWEQ du site d'interaction avec l'actine	62,4	71,3
1984-2148	59,4	69,1
2149-2272	22,1	35,9
2273-2329	44,6	69,6

Tableau 4: Recherche de régions conservées au niveau des 558 résidus C-terminaux de la taline

Différentes régions de la séquence de la taline1 humaine ont été comparées aux séquences de la taline de *C. elegans* et à celle de la drosophile. Les pourcentages d'identité ont été calculés pour les différentes régions analysées.

C. Conclusion et discussion

L'utilisation d'une partie cytoplasmique recombinante de β_3 , fusionnée à la GST, nous a permis de mettre au point un modèle pour l'étude de l'interaction *in vitro* de la taline avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ sans nécessité de purifier l'intégrine entière à partir de plaquettes sanguines. De plus, les résultats de cette étude nous ont permis de confirmer que le domaine élongé de la taline interagit avec la partie cytoplasmique de la sous-unité β_3 de l'intégrine.

Comme le domaine élongé de la taline ne contient pas de domaine FERM et ne possède pas d'homologie de séquence avec le domaine globulaire, il semble évident que le mécanisme d'interaction du domaine élongé diffère de celui du domaine globulaire. Alors qu'il a été montré que le domaine globulaire de la taline est responsable de l'activation des intégrines (Tadokoro et al., 2003), cette observation suggère également un autre rôle fonctionnel pour l'interaction du domaine élongé avec les intégrines.

Nous avons choisi, dans un premier temps, une approche bioinformatique pour disposer d'indications approximatives, concernant la localisation du site d'interaction avec les intégrines au niveau du domaine élongé de la taline. L'étude de l'identité et de l'homologie de séquence entre la taline humaine et celle de *C. elegans* ou celle de la drosophile nous a permis d'identifier deux régions particulièrement conservées au niveau des 558 résidus C-terminaux de la taline pouvant contenir le site d'interaction. Alors que la première région identifiée est constituée d'une séquence assez étendue (165 résidus \square 1984 à 2148), en aval du troisième site d'interaction avec la vinculine (résidus 1944 à 1969), la deuxième est courte (57 résidus \square 2273 à 2329) et localisée directement en amont du site d'interaction avec l'actine.

La taline contient trois sites d'interaction avec la vinculine, qui semblent chacun correspondre à un des nombreux motifs répétitifs, riches en alanines, contenus dans le domaine élongé de la taline (McLachlan et al., 1994; Bass et al., 1999). Comme ces motifs répétitifs s'étendent jusqu'au bout C-terminal de la taline, la question se pose si le site d'interaction avec les intégrines pourrait également correspondre à un de ces motifs. La première des deux régions conservées qu'on a identifiées par l'approche bioinformatique contient en effet 5 de ces motifs répétés alors que la deuxième région

RESULTATS

conservée se trouve à l'interface de deux motifs mais n'en contient aucun dans sa totalité. Une étude structurale récente a montré que le motif répétitif, correspondant au premier site d'interaction avec la vinculine, adopte une structure en 5 hélices α , nécessitant une activation conformationnelle pour interagir avec la vinculine (Papagrigoriou et al., 2004). Si le site d'interaction avec les intégrines correspondait effectivement à un des motifs répétitifs, un tel mécanisme d'activation pourrait également réguler l'interaction du domaine élongé de la taline avec les intégrines.

Néanmoins, toutes ces observations, basées sur l'analyse bioinformatique de la séquence de la taline, ne représentent que des indications hypothétiques qui seront étudiées par différentes approches expérimentales dans le chapitre II.

RESULTATS

Nom	aa de taline	Vecteur	Sites de restriction		Amorce sens (5'-3')	Amorce antisens (5'-3')
			Nt (5')	Ct (3')		
DsRed-taline A	1-433	pDsRed-N1	SacI	Sall	CTCGAGCTCATGGTTGCACT TTCACCTG	GGTGTGCGACTGCAGGACT GTTGACTT
DsRed-taline B	430-1076	pDsRed-N1	Sall	BamHI	GTAGTCGACAATGGTCTGCG AGCAGCAATAC	AATGGATCCGGAAGCTTG CCATCTCGAGTGTCTG
DsRed-taline C	1075-1623	pDsRed-N1	Sall	BamHI	GTTGTGCGACTATGAAGCTTA AACCCCTACCTGGG	AATGGATCCTAGTTGACT GCGAGGGCCCCGGCTGT
DsRed-taline D	1622-2270	pDsRed-N1	Sall	BamHI	GATGTCGACTATGGTCAACC CCCCGGACCCCCGAG	GTAGGATCCTCTGTCAAC TGCTGCTGAGTTGCTG
DsRed-taline E	2267-2541	pDsRed-N1	Sall	BamHI	GCAGTCGACTATGCAGTTG ACAGGACATTCAAAGCGTG	TATGGATCCCGTCTCTCA TCTCGAAGCTCTGAAG
DsRed-taline F	1984-2541	pDsRed-N1	Sall	BamHI	GTAGTCGACTATGGCTGTGT CTGGTATCATTGCTG	TATGGATCCCGTCTCTCA TCTCGAAGCTCTGAAG
DsRed-taline G	1984-2344	pDsRed-N1	Sall	BamHI	GTAGTCGACTATGGCTGTGT CTGGTATCATTGCTG	CTAGGATCCTGCTCTCA AAGTTC AAGGACTCATC
DsRed-taline H	1984-2270	pDsRed-N1	Sall	BamHI	GTAGTCGACTATGGCTGTGT CTGGTATCATTGCTG	GTAGGATCCTCTGTCAAC TGCTGCTGAGTTGCTG
DsRed-taline I	2267-2344	pDsRed-N1	Sall	BamHI	GCAGTCGACTATGCAGTTG ACAGGACATTCAAAGCGTG	CTAGGATCCTGCTCTCA AAGTTC AAGGACTCATC
DsRed-taline J	1984-2113	pDsRed-N1	Sall	BamHI	GTAGTCGACTATGGCTGTGT CTGGTATCATTGCTG	CTAGGATCCTGCCACACA GCAGGGTCATCTCCAAC
DsRed-taline K	2093-2344	pDsRed-N1	Sall	BamHI	CTAGTCGACTATGGACTCA TCAGTGCAACGAAGG	CTAGGATCCTGCTCTCA AAGTTC AAGGACTCATC
DsRed-taline L	2093-2270	pDsRed-N1	Sall	BamHI	CTAGTCGACTATGGACTCA TCAGTGCAACGAAGG	GTAGGATCCTGTGTCAAC TGCTGCTGAGTTGCTG
GFP-taline A	1-433	pEGFP-N1	SacI	Sall	CTCGAGCTCATGGTTGCACT TTCACCTG	GGTGTGCGACTGCAGGACT GTTGACTT
GFP-taline G	1984-2344	pEGFP-N1	Sall	BamHI	GTAGTCGACTATGGCTGTGT CTGGTATCATTGCTG	CTAGGATCCTGCTCTCA AAGTTC AAGGACTCATC
<i>Amyc</i>	1-433	pcDNA4/TO/mycHisB	EcoRI	XhoI	GCGAATTCGACGATGGTTG CACTTTCACCTGAAG	GTA CTGAGGACTGCAGG ACTGTGACTTTTTG
<i>Jmyc</i>	1977-2113	pcDNA4/TO/mycHisB	BamHI	EcoRI	GTAGGATCCATAATGGCCT GCATCACAGCAGCC	GGTGAATTCGCCACACA GCAGGGTCATCTCC
<i>J1myc</i>	1977-2018	pcDNA4/TO/mycHisB	BamHI	EcoRI	GTAGGATCCATAATGGCCT GCATCACAGCAGCC	GTTGAATTCCTCCCTCCGG TGGTCAGCGAAAGTT
<i>J2myc</i>	2010-2049	pcDNA4/TO/mycHisB	BamHI	EcoRI	GAGGGATCCGAGATGGAAA CTTTCGCTGACCAC	GTTGAATTCGGGCAGCC TGCGCAACTTCTCC
<i>J3myc</i>	2042-2080	pcDNA4/TO/mycHisB	BamHI	EcoRI	GAAGGATCCAAGATGGAGA AGTTGGCGCAGGCT	GTAGAATTCAGTACCACC TGGTCTCAGGGTCC
<i>J4myc</i>	2072-2113	pcDNA4/TO/mycHisB	BamHI	EcoRI	GAAGGATCCAATATGGAGG ACCCTGAGACCAG	GGTGAATTCGCCACACA GCAGGGTCATCTCC
GST-taline A	1-433	pGex-4T-2	EcoRI	Sall	GAGGAATTCGGATGGTTGC ACTTTCACCTGAAGATC	GCGTCGACTTACTGCTGC AGGACTGTTGACTT
GST-taline B	430-1076	pGex-4T-2	Sall	Sall	GTAGTCGACAATGGTCTGCG AGCAGCAATAC	GTAGTCGACTTAAAGCTT GCCATCTCGAGTGTCTG
GST-taline F	1984-2541	pGex-4T-2	Sall	Sall	GTAGTCGACTATGGCTGTGT CTGGTATCATTGCTG	GCAGTCGACTTAGTGCTC ATCTCGAAGCTCTGAAG
GST-taline G	1984-2344	pGex-4T-2	Sall	Sall	GTAGTCGACTATGGCTGTGT CTGGTATCATTGCTG	GACGTCGACTTACTGCTC CTCAAAGTTC AAGGACT
GST-taline H	1984-2270	pGex-4T-2	Sall	Sall	GTAGTCGACTATGGCTGTGT CTGGTATCATTGCTG	GCAGTCGACTTATGTCAA CTGCTGCTGAGTTCTG
GST-taline J	1984-2113	pGex-4T-2	Sall	Sall	GTAGTCGACTATGGCTGTGT CTGGTATCATTGCTG	CTAGTCGACTTACTGCCA CACAGCAGGGTCATCTC
GST-taline K	2093-2344	pGex-4T-2	Sall	Sall	CTAGTCGACTATGGACTCA TCAGTGCAACGAAGG	GACGTCGACTTACTGCTC CTCAAAGTTC AAGGACT

Tableau 5: Constructions de fragments de taline réalisées dans le cadre de cette étude

Des fragments d'ADNc de la taline humaine ont été insérés dans différents vecteurs. Le tableau montre les résidus de taline codés par les différents fragments et les vecteurs, sites de restriction et amorces utilisées. Au niveau des amorces, les sites de restriction sont représentés en bleu, les codants START et STOP en vert et la séquence de taline en orange.

Chapitre II

Identification et délimitation d'un site d'interaction avec β_3 au niveau du domaine élongé de la taline

Dans le premier chapitre nous avons i) confirmé que le domaine élongé de la taline interagit *in vitro* avec la partie cytoplasmique de la sous-unité β_3 des intégrines et ii) identifié deux régions conservées au niveau des 558 résidus C-terminaux de la taline, susceptibles de contenir le site d'interaction avec les intégrines. Pour délimiter ce site d'interaction, nous avons choisi une approche cellulaire et biochimique. Pour l'approche cellulaire, des fragments recombinants chevauchant la totalité de la séquence de la taline, fusionnés à DsRed, une protéine autofluorescente de *Discosoma* sp., ont été exprimés dans des cellules CHO $\beta_{1b}\beta_3$ -GFP et la localisation subcellulaire de ces fragments a été étudiée en microscopie à fluorescence. Le choix des protéines autofluorescentes GFP et DsRed nous a également permis d'étudier des interactions moléculaires au sein des cellules par la technique du FRET (fluorescence resonance energy transfer). Cette approche cellulaire a été complétée par une approche biochimique étudiant l'interaction *in vitro* des différents fragments recombinants de la taline, fusionnés à la GST, avec l'intégrine $\beta_{1b}\beta_3$ ou la partie cytoplasmique de β_3 , fusionnée à la GST (GST- β_3) par des techniques de co-précipitation ou de SPR.

A. Clonage, dans différents vecteurs, de fragments recombinants chevauchant la totalité de la séquence de la taline humaine

L'approche cellulaire et biochimique choisie nous a amenés à cloner de nombreux fragments recombinants de taline, fusionnés à DsRed, GFP ou un épitope *myc*-His (pour l'approche cellulaire), ou fusionnés à la GST (pour l'approche biochimique).

RESULTATS

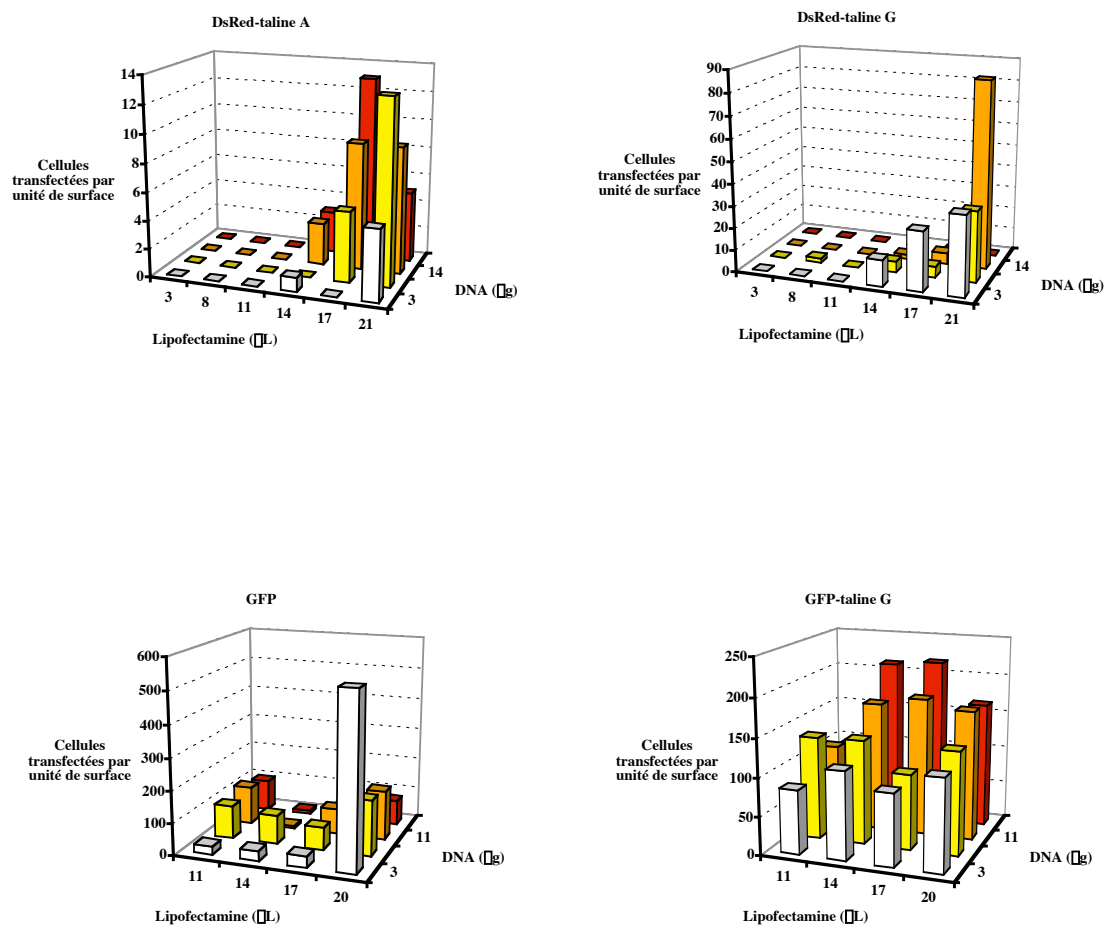


Figure 20: Quatre exemples d'optimisation de transfections transitoires dans les cellules CHO
CHO₃-GFP

Des quantités croissantes de DNA et de lipofectamine ont été utilisées pour transfecter les 4 constructions DsRed-taline A, DsRed-taline G, GFP et GFP-talineG dans les cellules CHO CHO₃, adhérentes sur des lamelles en verre. Après fixation des cellules au PFA, le nombre de cellules transfectées a été compté pour chaque lamelle sur une surface définie.

Tous les fragments d'ADNc de la taline ont été générés par RT-PCR à partir d'ARNm extrait d'une lignée cellulaire humaine erythroleucémique (HEL) ou par PCR à partir d'un fragment d'ADNc de taline existant. Les amorces utilisées lors de la PCR ont été conçues de manière à générer un site de restriction de part et d'autre du fragment. Après restriction enzymatique, les fragments ont été insérés par ligation dans les différents vecteurs. L'amplification de l'ADN plasmidique des différentes constructions a été réalisée dans des bactéries JM109 compétentes. Chaque construction a été vérifiée par séquençage automatique et comparée à la séquence de la taline humaine, déposée dans la base de données GenBank™ (référence \square AF078828). Le tableau 5 présente toutes les constructions réalisées.

B. Optimisation de la transfection transitoire des différents fragments dans les cellules CHO

Vu le nombre important de fragments de taline à étudier dans les cellules CHO, nous avons choisi d'étudier leur expression et localisation après transfection transitoire. Comme agent de transfection nous avons choisi la lipofectamine, un lipide cationique. Pour optimiser l'efficacité de transfection, différentes quantités d'ADN et de lipofectamine ont été testées. Des cellules étalées sur des lamelles en verre dans des plaques de culture à 6 puits ont été transfectées avec des quantités croissantes d'ADN allant de 3 à 18 μ g et de lipofectamine (2 μ g/ μ L) allant de 3 à 21 μ L. Après fixation des cellules sur chaque lamelle, le nombre de cellules transfectées a été compté au microscope à fluorescence sur une surface définie. La figure 20 montre les résultats ainsi obtenus pour 4 vecteurs différents \square DsRed-taline A, DsRed-taline G, GFP et GFP-taline G.

RESULTATS

Nom de la construction	Optimisation réalisée	Quantités retenues	
		ADN (µg)	lipofectamine (µL)
DsRed-taline A	+	15	18
DsRed-taline B	+	6-8	15-20
DsRed-taline C	+	/	/
DsRed-taline D	+	10	20
DsRed-taline E	-	10	10
DsRed-taline F	+	10	10
DsRed-taline G	+	10	20
DsRed-taline H	+	3	18
DsRed-taline I	-	7,5	10
DsRed-taline J	+	6	17
DsRed-taline K	+	3	20
DsRed-taline L	-	7,5	10
GFP	+	3	20
GFP-taline A	-	10	17
GFP-taline G	+	16	17
<i>Amyc</i>	-	6	18
<i>Jmyc</i>	-	6	18
<i>J1myc</i>	-	5	15
<i>J2myc</i>	-	5	15
<i>J3myc</i>	-	5	15
<i>J4myc</i>	-	5	15

Tableau 6: Optimisation de la transfection transitoire pour les différentes constructions de taline

Le tableau montre les constructions pour lesquelles une optimisation a été réalisée (+/-) ainsi que les quantités d'ADN et de lipofectamine retenues pour la transfections transitoires des constructions dans les cellules CHO.

Les différences observées entre ces 4 exemples soulignent la nécessité d'une optimisation des quantités d'ADN et de lipofectamine à utiliser pour chaque construction. Le tableau 6 résume les résultats retenus pour les transfections transitoires en boîtes de Pétri.

C. Article : A Fluorescence Cell Biology Approach to Map the Second Integrin-binding Site of Talin to a 130-Amino Acid Sequence within the Rod Domain

La taline possède un grand nombre de sites d'interactions avec des protéines impliquées dans l'attachement et l'étalement cellulaire, notamment deux sites d'interaction avec les intégrines et trois sites d'interaction avec l'actine, suggérant qu'elle joue un rôle central dans la connexion des intégrines au cytosquelette d'actine. Alors que l'interaction du domaine globulaire de la taline avec les intégrines a été élucidée en détail par des approches *in vitro* (Calderwood et al., 1999; Calderwood et al., 2002; Tadokoro et al., 2003; Ulmer et al., 2003), nous avons choisi une approche cellulaire pour délimiter le site d'interaction avec β_3 au niveau du domaine élongé de la taline. Pour cela nous avons utilisé les cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$ -GFP qui constituent un modèle établi et caractérisé récemment dans notre laboratoire. En effet, l'intégrine humaine $\alpha_{IIb}\beta_3$ -GFP, exprimée de manière recombinante dans les cellules CHO, est fonctionnelle, exprimée à la surface membranaire et localisée dans les AF (Plançon et al., 2001).

Cette étude nous a permis de délimiter le site d'interaction avec β_3 du domaine élongé de la taline à une séquence de 130 résidus (acides aminés 1984 à 2113) et de souligner, par la technique du FRET, son importance physiologique *in vivo*. Une première caractérisation du site d'interaction au niveau de β_3 a été réalisée par des expériences de SPR, montrant que le résidu Y⁷⁴⁷ du motif NPXY de la partie cytoplasmique de β_3 est requis pour l'interaction avec le domaine élongé de la taline. Le rôle fonctionnel de cette interaction a été abordé par des expériences en cytométrie à flux, étudiant la fixation de l'anticorps PAC-1, spécifique de la forme activée de $\alpha_{IIb}\beta_3$, sur les cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$, transfectées avec différents fragments de taline, montrant que l'interaction du domaine élongé avec β_3 ne semble pas impliquée dans l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Par ailleurs, cette étude nous a permis de mettre en évidence une séquence de taline (résidus 1622 à 2270) marquant des structures granulaires intracellulaires. Une telle localisation n'a jamais été observée pour la taline entière et pourrait suggérer une implication de la taline dans des mécanismes de transport vésiculaire.

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Laurent Tremuth, Stephanie Kreis, Chantal Melchior, Johan Hoebeke, Philippe Rondé, Sébastien Plançon, Kenneth Takeda, and Nelly Kieffer.

A fluorescence cell biology approach to map the second integrin-binding site of talin to a 130-amino acid sequence within the rod domain.

Journal of Biological Chemistry, 279, 22258-22266

Pages 22258-22266 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/279/21/22258>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

RESULTATS

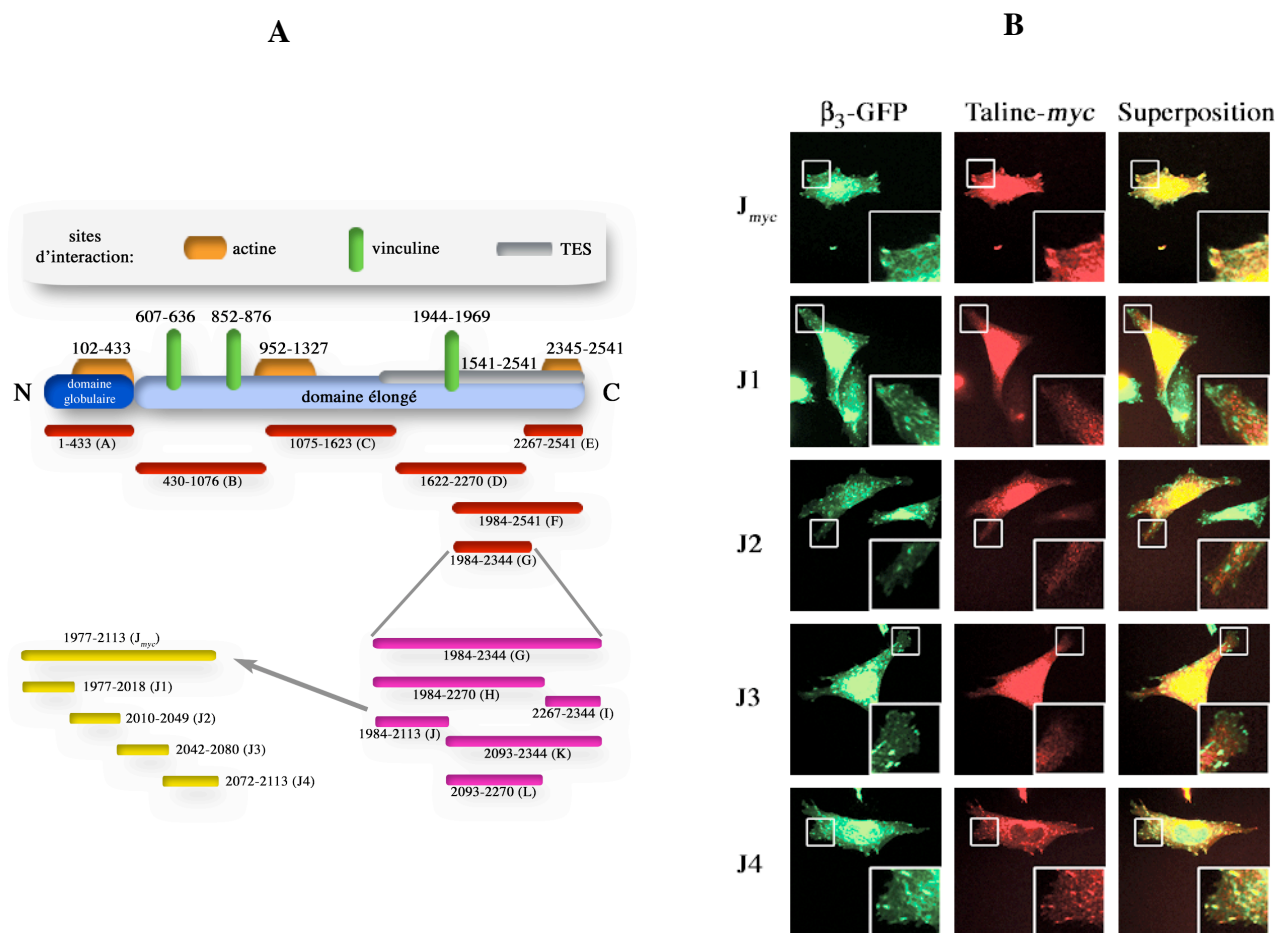


Figure 21: Détermination de la séquence minimale du domaine élongé de la taline, pouvant interagir avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

(A) Schéma de tous les fragments recombinants de taline générés lors de cette étude. Pour identifier la séquence minimale d'interaction avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, quatre fragments chevauchants de taline (jaune, J1, J2, J3 et J4), tous compris dans le fragment J_{myc} , ont été générés. (B) La localisation subcellulaire de ces quatre fragments, exprimés comme protéines de fusion avec un épitope myc -His, a été étudiée dans des cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$ -GFP.

D. Détermination de la séquence minimale du domaine élongé de la taline, pouvant interagir avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

L'approche cellulaire nous a permis de délimiter le site d'interaction avec β_3 à un fragment de 130 acides aminés (fragment taline J, acides aminés 1984 à 2113). Afin de délimiter encore plus précisément le site d'interaction, nous avons choisi de surexprimer, dans les cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$ -GFP, quatre fragments de taline d'une quarantaine d'acides aminés, recouvrant le fragment J. Ces peptides ont été exprimés comme protéines de fusion avec un épitope *myc*-His (21 résidus) au lieu de la protéine DsRed afin d'éviter un encombrement stérique, dû à la grande taille de DsRed (plus de 200 résidus) par rapport au peptide de taline à étudier. Les 4 constructions *J1myc*, *J2myc*, *J3myc* et *J4myc* (figure 21A) ont été transfectées transitoirement dans les cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$ -GFP et la localisation subcellulaire des fragments de taline a été étudiée par immunofluorescence indirecte, dans les cellules étalées sur fibrinogène, à l'aide d'un anticorps primaire de souris anti-*myc* et un anticorps secondaire, dirigé contre les IgG de souris et couplé à la rhodamine. La figure 21B montre que seul le fragment J4 colocalisait avec β_3 -GFP au niveau des AF alors que J1, J2 et J3 étaient localisés de manière diffuse au niveau du cytoplasme. Comme nous avons montré que la colocalisation de J avec β_3 (Chapitre II, Figure 6B) correspond à une interaction avec la partie cytoplasmique de β_3 (Chapitre II, Figure 6D), ces résultats suggèrent que le site d'interaction avec β_3 est compris dans le fragment J4 de 42 acides aminés (résidus 2072 à 2113) du domaine élongé de la taline.

RESULTATS

E. Conclusion et discussion

L'approche choisie, d'exprimer des fragments recombinants de la taline, fusionnés à DsRed, dans des cellules CHO β_3 -GFP a été validée par l'observation, au microscope à fluorescence, de localisations subcellulaires spécifiques des différents fragments. Ainsi le domaine globulaire (taline A), qui interagit avec les intégrines, ou le fragment taline B, qui contient un site d'interaction avec la vinculine, étaient localisés au niveau des AF, le fragment E, qui contient un site d'interaction avec l'actine, marquait des filaments d'actine et des petits fragments de taline (I, K et L), qui ne semblent pas contenir de domaine fonctionnel, étaient localisés de manière diffuse au niveau du cytoplasme.

Dans le premier chapitre nous avons identifié deux régions conservées au niveau des 558 résidus C-terminaux de la taline, susceptibles de contenir le site d'interaction avec les intégrines (Figure 19). Il est intéressant à noter que tous les fragments de taline contenant la première de ces régions conservées (résidus 1984 à 2148) localisaient dans les AF et interagissaient avec β_3 (fragments de taline F, G, H et J). D'un autre côté, les fragments de taline contenant uniquement la deuxième région conservée (résidus 2273 à 2329) ou la région moins conservée des résidus 2149 à 2272 n'interagissaient pas avec l'intégrine et ne localisaient pas au niveau des AF (fragments de taline I, K et L).

La localisation granulaire du fragment taline D (résidus 1622-2270), qui n'a pas été investiguée d'avantage, semble particulièrement intéressante, suggérant une implication de la taline dans des mécanismes de transport vésiculaire. Même si le fragment D contient également le site d'interaction avec β_3 (résidus 1984-2113) de la taline, il n'était pas localisé au niveau des AF, suggérant une plus forte affinité de la séquence impliquée dans la localisation granulaire comparée à l'affinité pour β_3 . Une co-localisation avec des structures granulaires n'a jamais été montrée pour la taline entière. Néanmoins, d'autres protéines comme mHip1R ou Sla2p possèdent un domaine d'interaction avec l'actine, similaire au domaine I/LWEQ de la taline, et sont impliquées dans le mécanisme de l'endocytose. Dans ces cas, le cytosquelette d'actine sert d'échafaudage à la machinerie d'endocytose. Ainsi mHip1R est localisé dans des structures vésiculaires, mais cette localisation n'implique pas son site d'interaction

avec l'actine C-terminal, similaire à celui de la taline, mais un domaine central, récemment identifié (Engqvist-Goldstein et al., 1999). De même Sla2p, une protéine de levure, est essentielle pour le mécanisme d'endocytose récepteur-dépendant, impliquant un domaine N-terminal, indépendamment de son domaine C-terminal d'interaction avec l'actine (Wesp et al., 1997). Comme la taline entière ne colocalise pas avec des structures vésiculaires, nos résultats suggèrent un site cryptique qui pourrait être exposé suite au clivage de la taline par la calpaine. L'importance de la localisation vésiculaire du fragment D est soulignée par des études montrant que l'inhibition ou l'invalidation de l'expression de la taline affecte le transport des intégrines et leur expression à la surface cellulaire (Albiges-Rizo et al., 1995; Priddle et al., 1998). On pourrait donc imaginer que le domaine hypothétique d'interaction avec des vésicules au niveau du domaine élongé de la taline établit un lien entre des filaments d'actine et des vésicules de transport, contenant les intégrines.

Nous avons montré que l'interaction du domaine élongé avec la partie cytoplasmique de α_3 ne semble pas impliquée dans l'activation de l'intégrine. Le rôle fonctionnel de cette interaction reste donc largement inconnu. Néanmoins les nombreux sites d'interaction avec des protéines des AF suggèrent un rôle structural pour le domaine élongé de la taline dans la connexion des intégrines au cytosquelette. Ce rôle structural pourrait intervenir après l'activation des intégrines par le domaine globulaire, soit dans l'adhérence et l'étalement cellulaire, qui sera étudié dans le chapitre III des résultats, soit dans des mécanismes plus dynamiques comme la transduction de forces mécaniques lors de la migration cellulaire. Pour le moment il n'est pas connu quand et où la calpaine clive la taline en son domaine globulaire et élongé. La réponse à cette question devrait fournir des éléments importants pour la compréhension du rôle fonctionnel de la taline dans les mécanismes d'adhérence, d'étalement et de migration cellulaire.

Chapitre III

Étude fonctionnelle de l'interaction du domaine élongé de la taline avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

Après avoir précisément identifié dans le chapitre II le site d'interaction avec les intégrines, situé au niveau des résidus 2072 à 2113 du domaine élongé de la taline, nous allons entamer l'étude fonctionnelle de cette interaction. Les nombreux sites d'interaction du domaine élongé avec, entre autres, les intégrines et l'actine suggèrent un rôle structural important dans la connexion des intégrines au cytosquelette, qui intervient lors de l'étalement et la migration cellulaire. Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons choisi comme approche expérimentale de surexprimer dans les cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$ des peptides de taline, contenant le site d'interaction avec β_3 , et d'étudier leur effet inhibiteur sur la dynamique de l'adhérence et de l'étalement cellulaire. Dans un premier temps, nous avons tenté de définir, par une analyse d'homologie de séquence, le peptide minimal correspondant au site de contact avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et nous avons étudié la dynamique de l'étalement de cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$, ayant internalisé un peptide synthétique comportant cette séquence minimal. Dans un deuxième temps, des études similaires ont été menées à l'aide de cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$, exprimant de façon stable et inductible le domaine globulaire (fragment taline A) ou le fragment J du domaine élongé.

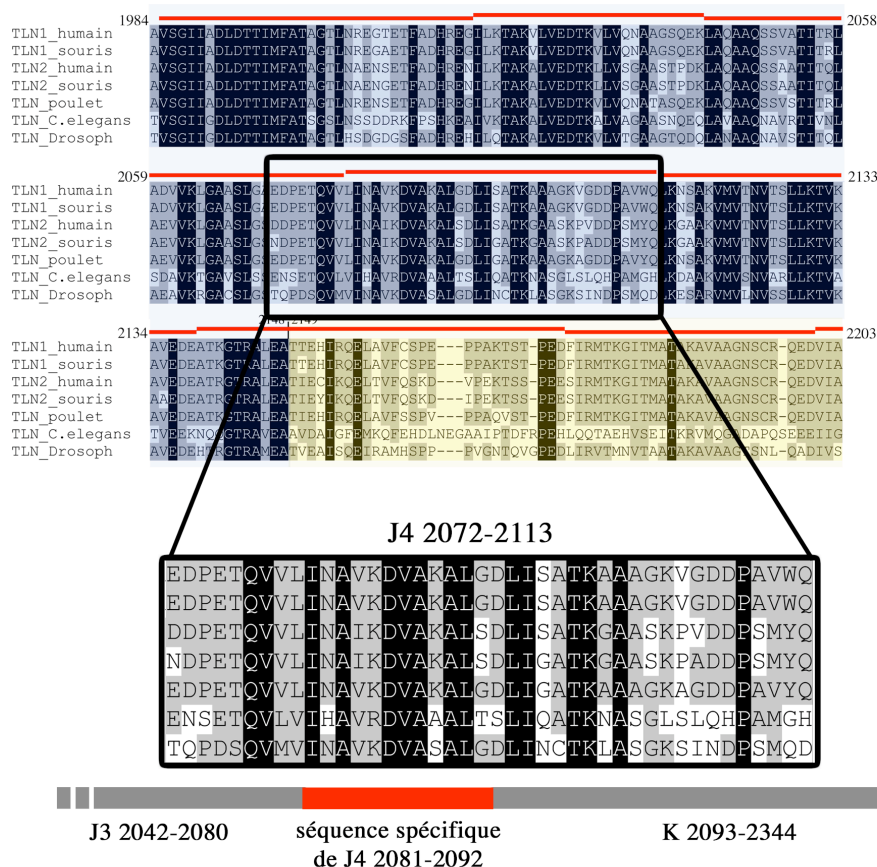
A. Étude d'un peptide synthétique minimal d'interaction avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

A.1. Analyse des homologies de séquence du fragment J4 de la taline de différentes espèces

Dans le chapitre I nous avons analysé un alignement de séquences de 7 molécules de taline1 et taline2 de 5 espèces différentes (Figure 19). La figure 22A reprend cet alignement au niveau du fragment J4 de la taline. De plus, sur cette figure, les

RESULTATS

A



B

peptide taline: **Bio-RKKRRQRRR-INA**VDVAKALG

peptide contrôle: **Bio-RKKRRQRRR-ADV**ANILKAVGK

Figure 22: Analyse des homologies de séquence du fragment J4 de la taline de différentes espèces

(A) L'alignement de séquences de 7 molécules de talines de 5 espèces différentes a été repris de la figure 19. Le séquence du fragment de taline a été mis en évidence. De plus sont représentés les séquences des fragments de taline J3 et K (gris) ainsi que la séquence spécifique de J4 (rouge). (B) Deux peptides ont été synthétisés : un peptide taline, de séquence INAVKDVAKALG, et un peptide contrôle comportant les mêmes résidus mais dans un ordre aléatoire. Les deux peptides ont été synthétisés en fusion avec la séquence RKKRRQRRR de la protéine tat du VIH (bleu). De plus chaque peptide a été biotinylé du côté N-terminal (vert).

fragments de taline J3 (résidus 2042 à 2080, gris) et K (résidus 2093 à 2344, gris), qui recouvrent partiellement le fragment J4 mais qui ne colocalisent pas avec \square_3 au niveau des AF, sont mis en évidence. La séquence spécifique au fragment J4, c'est-à-dire les résidus 2081 à 2092 (rouge), contient en tout 7 résidus conservés à travers toutes les espèces. De plus les séquences en aval et en amont sont un peu moins conservées, notamment quand on compare la séquence de la taline1 humaine à celle de la taline de *C. elegans* ou de la drosophile (Tableau 7), suggérant que les résidus 2081 à 2092 pourraient contenir le site d'interaction avec \square_3 . Cette séquence a été retenue pour la synthèse de différents peptides. Deux peptides ont été synthétisés (en collaboration avec le Dr Sylviane Muller par l'équipe du Dr Jean-Paul Briand, Immunologie et Chimie Thérapeutiques CNRS UPR9021 à Strasbourg) : un peptide appelé « peptide taline », comportant la séquence ²⁰⁸¹INAVKDVAKALG²⁰⁹² de la taline et un « peptide contrôle », comportant les mêmes résidus mais dans un ordre aléatoire : ADVANILKAVGK. Les deux peptides ont été synthétisés en fusion avec la séquence RKKRRQRRR de la protéine tat du VIH-1 et ont été biotinilés (Figure 22B). La séquence RKKRRQRRR de la protéine tat du VIH-1 favorise la transduction de polypeptides à travers la membrane cellulaire (Watson & Edwards, 1999; Schwarze et al., 2000). De nombreuses études ont utilisé cette séquence pour la transduction *in vitro* et *in vivo* de protéines aussi larges que 120 kDa (Fawell et al., 1994; Nagahara et al., 1998; Schwarze et al., 1999; Vocero-Akbani et al., 1999).

Séquence de la taline1 humaine	% d'identité avec la taline de <i>C. elegans</i>	% d'identité avec la taline de la drosophile
2072-2113 (fragment J4)	52,4	57,1
2077-2101	64,0	76
2081-2092 (séquence spécifique à J4)	66,7	91,7

Tableau 7: Analyse de l'homologie de séquence entre la taline1 humaine et la taline de *C. elegans* et de la drosophile au niveau du fragment J4

Différentes régions de la séquence de la taline1 humaine ont été comparées aux séquences de la taline de *C. elegans* et à celle de la drosophile. Des pourcentages d'identité ont été calculés pour les différentes régions analysées.

RESULTATS

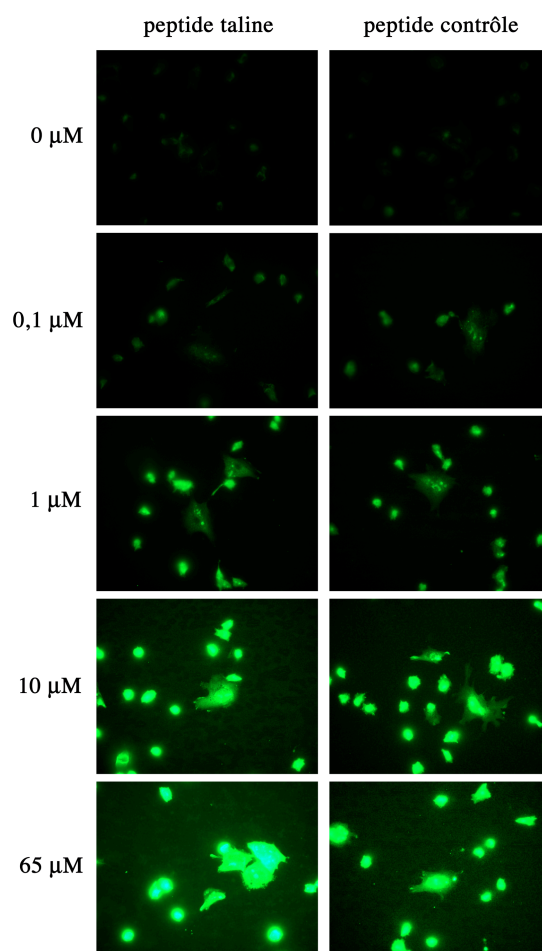


Figure 23: Étude de l'internalisation des peptides synthétiques taline et contrôle dans les cellules CHO β_{int}^3

Des cellules CHO β_{int}^3 adhérentes ont été incubées pendant 2 heures à 37°C en présence de concentrations croissantes (0, 0,1, 10 et 65 μM) des peptides taline et contrôle. L'internalisation des peptides biotinilés a été vérifiée par immunofluorescence indirecte à l'aide de streptavidine couplée au FITC

A.2. Étude de l'internalisation des peptides synthétiques dans les cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$

Une étude d'internalisation des peptides a été réalisée sur des cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$, adhérentes sur lamelles en verre. Les cellules adhérentes ont été incubées pendant 2 heures à 37°C en présence de concentrations croissantes (0, 0,1, 10 et 65 μ M) de peptide. Les cellules ont alors été lavées au PBS et fixées au PFA. L'internalisation des peptides biotinilés a été vérifiée par immunofluorescence indirecte à l'aide de streptavidine, couplée au FITC. L'observation des intensités de fluorescence au microscope à fluorescence montre que les deux peptides sont internalisés dans les cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$ et cela de manière concentration dépendante (Figure 23).

A.3. Étude de l'effet fonctionnel du peptide taline sur l'adhérence des cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$ sur fibrinogène

Pour étudier l'hypothèse que l'interaction du domaine élongé avec β_3 est impliquée dans le mécanisme d'adhérence et d'étalement cellulaire, nous avons voulu vérifier si la compétition du peptide taline avec le domaine élongé de la taline endogène pouvait soit provoquer le détachement de cellules adhérentes soit retarder l'étalement cellulaire sur fibrinogène.

Dans un premier temps, pour observer un éventuel détachement cellulaire, des cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$, adhérentes sur fibrinogène, ont été incubées en présence de concentrations croissantes (0 à 65 μ M) des peptides taline et contrôle. Les cellules ont été observées au microscope à contraste de phase à des intervalles réguliers pendant au moins 4 heures et le nombre de cellules adhérentes ou détachées a été compté. La figure 24A montre qu'aucun détachement cellulaire n'a pu être observé au bout de 4 heures, même pour la concentration la plus élevée de peptide taline (65 μ M).

RESULTATS

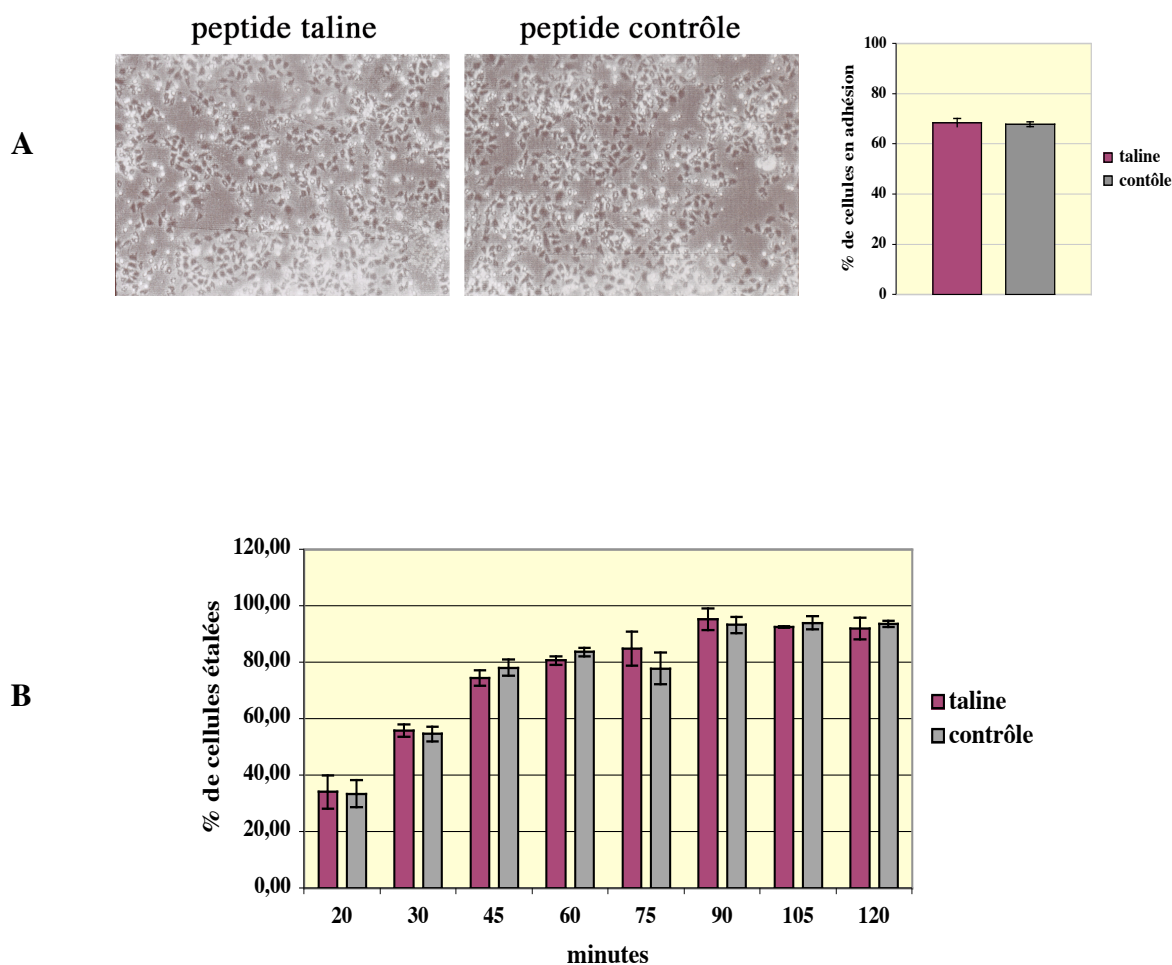


Figure 24: Étude de l'effet fonctionnel du peptide taline sur l'adhérence des cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$ sur fibrinogène

(A) Des cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$, adhérentes sur fibrinogène, ont été incubées en présence de 65 μ M des peptides taline et contrôle. Après 4 heures les cellules ont été photographiées au microscope à contraste de phase et le nombre de cellules adhérentes ou détachées a été compté. (B) Des cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$ en culture ont été détachées et incubées en suspension en présence de 65 μ M de peptides taline ou contrôle. Après deux heures, les cellules en suspension ont été déposées sur des lamelles en verre, recouvertes de fibrinogène. L'adhérence et l'étalement des cellules a été suivi à des intervalles réguliers au microscope à contraste de phase et le nombre de cellules étalées a été compté

Dans un deuxième temps, pour observer une éventuelle inhibition de l'adhérence cellulaire, des cellules CHO $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ en culture ont été détachées et incubées en suspension en présence de concentrations croissantes de peptide taline ou contrôle. Après deux heures, les cellules en suspension ont été déposées sur des lamelles en verre, recouvertes de fibrinogène. L'adhérence et l'étalement des cellules a été suivi à des intervalles réguliers au microscope à contraste de phase et le nombre de cellules étalées a été compté. Même pour la concentration de peptides la plus élevée (65 μM), les cellules incubées en présence de peptide taline s'étaient de la même manière et avec la même vitesse que les cellules incubées avec le peptide contrôle et aucune inhibition de l'adhérence cellulaire en présence du peptide taline n'a pu être mise en évidence (Figure 24B).

A.4. Étude de la localisation subcellulaire des peptides dans les cellules CHO $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$

Comme le peptide taline ne semble avoir aucun effet inhibiteur sur l'adhérence et l'étalement cellulaire, la question se pose s'il contient un site fonctionnel d'interaction avec β_3 . Pour répondre à cette question, nous avons déterminé la localisation subcellulaire du peptide pour voir s'il était capable de colocaliser avec l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ au niveau des AF. Comme décrit précédemment, des cellules CHO $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ont été incubées en présence de concentrations croissantes de peptides taline et contrôle (0 à 65 μM) et ont été déposées sur des lamelles en verre recouvertes de fibrinogène. À différents temps d'adhérence (20 minutes à 2 heures), les cellules ont été fixées au PFA et la localisation subcellulaire des peptides a été visualisée à l'aide de streptavidine couplée au FITC. De plus, la sous-unité β_3 des intégrines a été marquée avec l'anticorps anti- β_3 P37 et un anticorps secondaire couplé à la rhodamine. L'observation des cellules au microscope à fluorescence a révélé que pour toutes les concentrations de peptides utilisées et tous les temps d'adhérence testés, le marquage obtenu, aussi bien pour le peptide taline que pour le peptide contrôle, correspondait à

RESULTATS

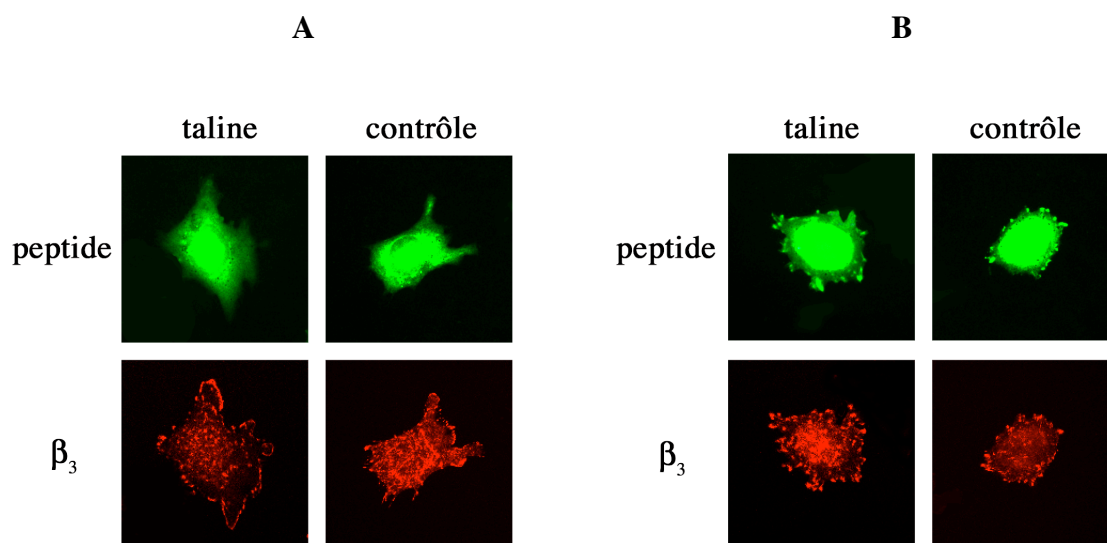


Figure 25: Étude de la localisation subcellulaire des peptides taline et contrôle dans les cellules CHO β_3

Des cellules CHO β_3 ont été incubées en présence de 65 μ M de peptides taline et contrôle et ont été déposées sur des lamelles en verre recouvertes de fibrinogène. Après 1 heure d'adhérence, les cellules ont été fixées au PFA et la localisation subcellulaire des peptides a été visualisée à l'aide de streptavidine couplée à FITC. La sous-unité β_3 des intégrines a été marquée avec l'anticorps anti- β_3 P37 et un anticorps secondaire couplé à la rhodamine. **(A)** Le marquage observé, aussi bien pour le peptide taline que pour le peptide contrôle, correspondait à un marquage diffus du cytoplasme. **(B)** Dans 10 à 15 % des cellules, les deux peptides étaient regroupés dans des points situés à la périphérie cellulaire.

un marquage diffus du cytoplasme, sans aucune colocalisation avec β_3 au niveau des AF (Figure 25A). Dans un petit nombre de cellules (0 à 10 % environ selon le temps d'adhésion), le peptide taline était regroupé dans des points situés à la périphérie cellulaire, or cette localisation n'était pas spécifique car elle était également observée pour le peptide contrôle (Figure 25B). Le caractère artefactuel de cette localisation, qui pourrait être due au caractère très hydrophile et basique de la séquence RKKRRQRRR de la protéine tal, a été démontré par l'étude d'un deuxième peptide contrôle de séquence AAGLILKVVNDA qui exhibait exactement la même localisation subcellulaire que le peptide taline et le premier peptide contrôle.

A.5. Conclusion

Pris ensemble, ces résultats suggèrent que le choix de la séquence des 12 résidus pour le peptide taline était trop restrictif et que le peptide taline ne contient pas tous les résidus, nécessaires à l'interaction avec β_3 . C'est pourquoi nous avons choisi une deuxième approche pour étudier le rôle fonctionnel de l'interaction du domaine élongé de la taline avec β_3 , c'est-à-dire l'étude de lignées stables, surexprimant les fragments de taline A et J, qui contiennent les deux sites d'interaction avec β_3 .

B. Étude de lignées stables inductibles surexprimant les fragments taline A et J

Plusieurs essais d'obtention de clones stables de cellules CHO $\beta_{nb}\beta_3$, surexprimant les fragments de taline A ou J, ont échoués, suggérant soit un effet toxique des fragments recombinants, soit un effet inhibiteur des fragments sur l'adhérence cellulaire, nécessaire à la survie des cellules. C'est pourquoi nous avons choisi de générer des clones cellulaires stables permettant l'induction de l'expression des fragments de taline A et J. Pour cela nous avons utilisé le système T-Rex (Invitrogen) qui permet d'exprimer les fragments recombinants de taline sous contrôle d'un répresseur. Deux plasmides sont utilisés et transfectés dans les cellules. Le premier (pcDNA4/TO/*myc*-His) contient l'ADNc codant pour le fragment d'intérêt (taline A

RESULTATS

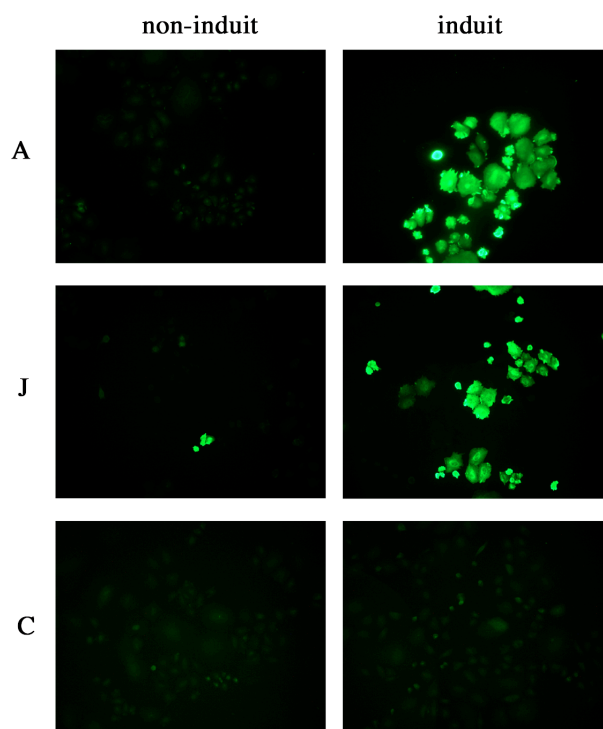


Figure 26: Transfection stable des fragments de taline A et J dans les cellules CHO $\square_{11b}\square_3$ à l'aide du système inductible T-Rex

Les fragments de taline A et J ont été transfectés de manière stable et inductible dans des cellules CHO $\square_{11b}\square_3$ à l'aide du système T-Rex. Une lignée cellulaire contrôle (C) a été établie, exprimant uniquement le répresseur du système T-Rex mais pas de fragment de taline. La figure montre l'expression des fragments de taline dans les trois clones cellulaires A, J et C en conditions non-induites et induites.

ou taline J), précédé d'un opérateur TetO2 (Tet operator 2) et le deuxième (pcDNA6/TR) code pour une protéine tetR (tet repressor) qui est transportée dans le noyau cellulaire où elle se fixe sur l'opérateur TetO2, inhibant l'expression de la protéine d'intérêt. De la tétracycline, ajoutée dans le milieu de culture des cellules, peut traverser les membranes plasmiques et nucléaire et se complexer à tetR pour lever la répression de la protéine d'intérêt.

B.1. Transfection stable des fragments de taline A et J dans les cellules CHO α à l'aide du système inducible T-Rex

Trois lignées stables de cellules CHO α ont été établies i) une lignée appelée «A», exprimant le fragment de taline *Amyc* de manière inducible, ii) une lignée appelée «J», exprimant le fragment taline *Jmyc* sous contrôle du répresseur tetR et iii) une lignée contrôle appelée «C», exprimant uniquement le répresseur tetR mais pas de fragment taline. Des cellules CHO α ont été transfectées dans des boîtes de Pétri de 100 mm en présence de 20 μ L de lipofectamine et des vecteurs correspondants. Pour les lignées A et J, les vecteurs pcDNA4/TO/*myc*-His-taline A (3 μ g) ou pcDNA4/TO/*myc*-His-taline J (3 μ g) ont été cotransfectés avec le vecteur pcDNA6/TR (18 μ g) et pour la lignée C, seul le vecteur pcDNA6/TR (18 μ g) a été transfecté. 48 heures après transfection, les agents de sélection zéocine (0,6 mg/mL pour pcDNA4/TO/*myc*-His) et blasticidine (3 μ g/mL pour pcDNA6/TR) ont été rajoutés dans le milieu de culture et 5 à 7 jours plus tard, des colonies isolées de cellules résistantes ont été repiquées à l'aide de cylindres de clonage. Ces colonies ont été mises en culture et amplifiées, d'abord dans des plaques de culture à 24 puits, puis dans des plaques à 6 puits. Ensuite, l'expression des protéines d'intérêt (taline A et taline J) en conditions non-induites et induites (induction de base 24 heures en présence de 1 μ g/ μ L de tétracycline) a été testée en immunofluorescence à l'aide d'un anticorps primaire anti-*myc* et d'un anticorps secondaire couplé au FITC. Les clones cellulaires montrant la plus grande différence d'expression des fragments A ou J entre l'état non induit et induit ont été retenus pour un sous-clonage par dilution limite dans des plaques à 96 puits, afin de garantir une homogénéité au niveau de l'expression et

RESULTATS

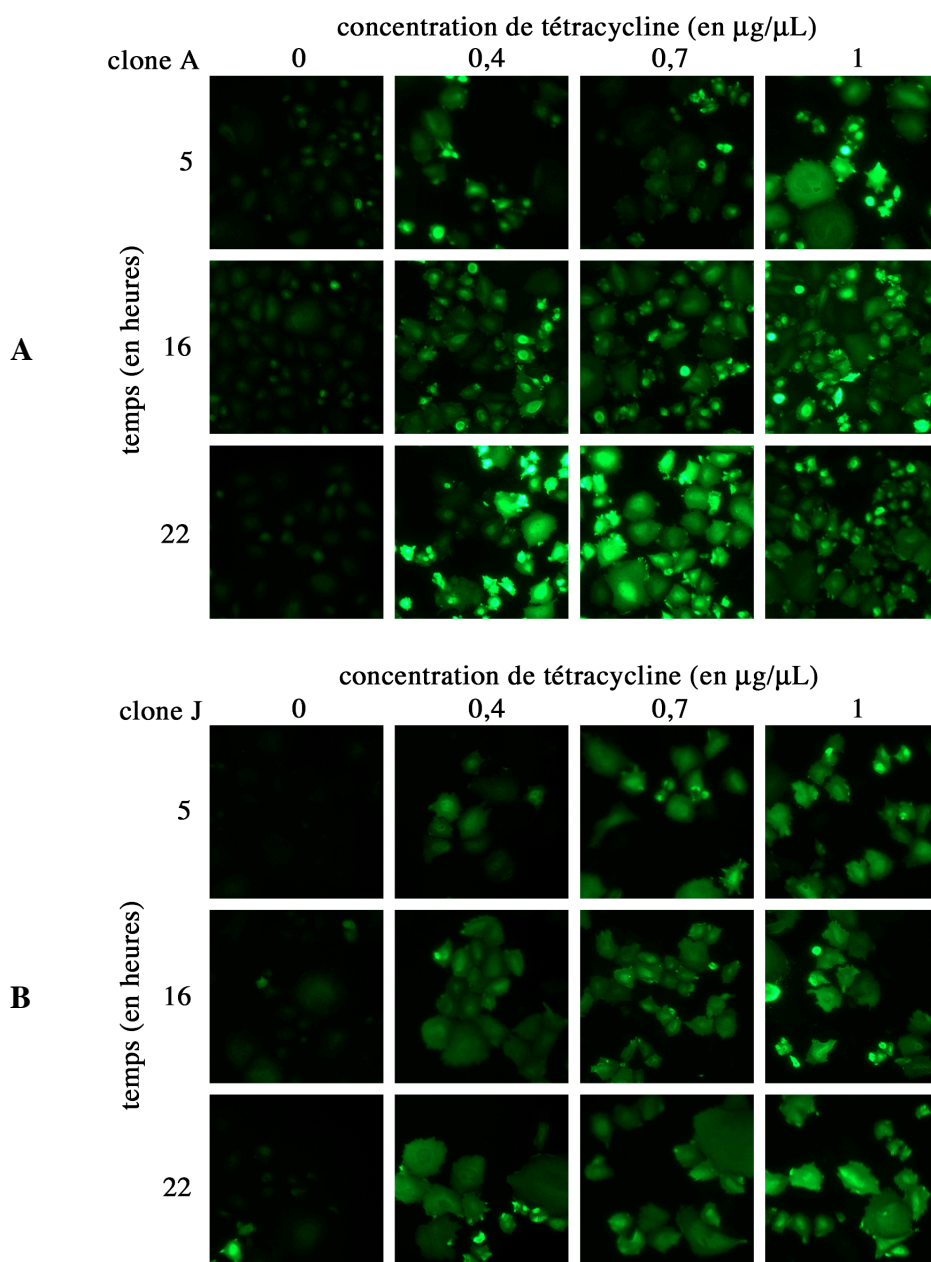


Figure 27: Étude de l'induction des fragments de taline A et J en fonction du temps et de la concentration de tétracycline

Les cellules des clones A (A) et J (B), adhérentes sur des lamelles en verre, ont été induites en présence de tétracycline (0, 0,4, 0,7 et 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Après 5, 16 ou 22 heures, les cellules ont été fixées et les quantités de fragment A ou J exprimées ont été révélées par immunofluorescence.

de l'induction des fragments de taline. La figure 26 montre la caractérisation par immunofluorescence en conditions non-induites et induites des trois clones A, J et C ainsi obtenus. L'induction des clones A et J résulte dans l'expression nettement augmentée des fragments de taline A et J alors qu'en conditions non-induites, le niveau basal d'expression est assez faible. Comme le clone C n'exprime pas de fragment taline, aucun signal n'a pu être détecté à l'aide de l'anticorps anti-*myc*.

B.2. Étude de l'induction des fragments de taline A et J en fonction du temps et de la concentration de tétracycline

Pour permettre l'expression des fragments de taline A et J au niveau le plus élevé possible, nous avons optimisé les conditions d'induction en testant des concentrations croissantes de tétracycline pour différents temps d'induction. Les cellules des clones A et J, adhérentes sur des lamelles en verre, déposées dans des plaques de 24 puits, ont été induites en présence de tétracycline (0, 0,4, 0,7 et 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Après 5, 16 ou 22 heures, les cellules ont été fixées et les quantités de fragment A ou J exprimées ont été révélées en immunofluorescence comme décrit précédemment. La figure 27 montre que pour les deux lignées cellulaires (A et J), l'efficacité de l'induction augmente faiblement avec la concentration de tétracycline utilisée et avec le temps d'induction. Néanmoins une induction de 5 heures avec 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de tétracycline est suffisante pour induire visiblement l'expression des fragments de taline. Pour des raisons pratiques, nous avons retenu, pour les expériences suivantes, une induction avec 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de tétracycline pendant la nuit, soit 15 heures.

RESULTATS

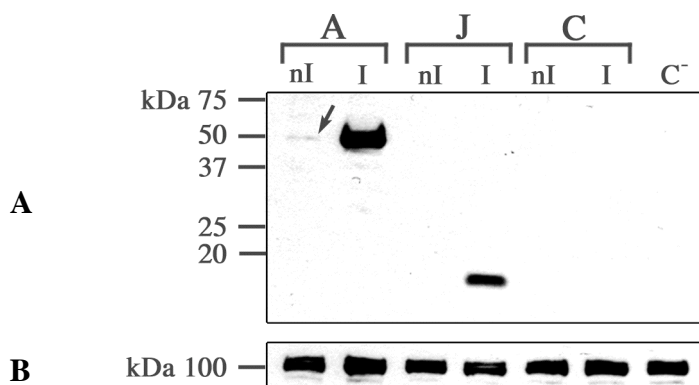


Figure 28: Étude immunochimique de l'expression des fragments de taline A et J en conditions non-induites et induites

(A) Des lysats cellulaires des clones A, J, C en conditions non-induites (nI) et induites (I) ont été analysés par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-*myc*. Dans le dernier puits, un lysat de cellules CHO $\beta_{IIb}\beta_3$ non transfectées a été déposé (C). La flèche indique une faible bande, correspondant à la quantité résiduelle de fragment taline A, exprimée en conditions non-induites. (B) Pour illustrer que les mêmes quantités de protéines ont été déposées pour chaque échantillon, la membrane de nitrocellulose a été réincubée avec un anticorps anti- β -actinine

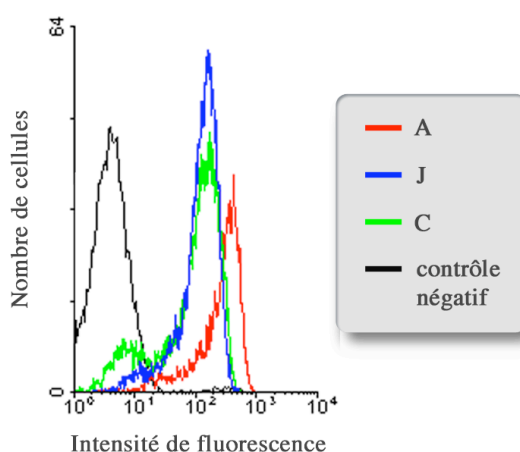


Figure 29: Étude de l'expression de l'intégrine $\beta_{IIb}\beta_3$ à la surface des lignées stables A, J et C

Les cellules des clones cellulaire A (rouge), J (bleu) et C (vert) ont été marquées à l'aide d'un anticorps primaire spécifique du complexe $\beta_{IIb}\beta_3$ (P12-73) et la quantité de $\beta_{IIb}\beta_3$, exprimée à la surface membranaire a été analysée par cytométrie de flux. L'intensité du marquage de $\beta_{IIb}\beta_3$ a été reportée en abscisse et le nombre de cellules comptées en ordonnée. Un échantillon de cellules non marquées (absence de l'anticorps primaire) a servi de contrôle négatif (noir).

B.3. Étude immunochimique de l'expression des fragments de taline A et J en conditions non-induites et induites

Pour comparer le niveau d'expression des fragments de taline A et J en conditions non-induites et induites, des cellules des clones A, J et C ont été lysées en conditions non-induites et induites. Après dosage protéique, des quantités identiques de chaque échantillon ont été déposées sur un gel de polyacrylamide. Après électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose et les fragments de taline A et J ont été révélés en Western blot par une réaction de chimioluminescence à l'aide d'un anticorps primaire anti-*myc* et d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort. La figure 28A montre qu'après induction, des protéines de 50 et 17 kDa ont pu être détectées pour les clones A et J respectivement. Ces masses moléculaires correspondent à celles calculées pour les fragments de taline A et J fusionnés à l'épitope *myc*-His (460 et 160 acides aminés respectivement). L'expression du fragment A semble plus importante que celle du fragment J. En conditions non-induites, la répression de l'expression du fragment J est complète alors qu'une faible expression résiduelle peut être observée pour le fragment A (flèche). Pour illustrer que les mêmes quantités de protéines ont été déposées pour chaque échantillon, la membrane de nitrocellulose a été réincubée avec un anticorps anti- β -actinine, une protéine abondante du cytosquelette d'une masse moléculaire de 100 kDa environ (900 résidus) (Figure 28B).

B.4. Étude de l'expression de l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ à la surface des lignées stables A, J et C

Pour vérifier l'expression de l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ par les clones A, J et C, une expérience de cytométrie à flux a été réalisée. Les cellules des trois clones A, J et C en culture ont été détachées sans induction au préalable et ont été marquées à l'aide d'un anticorps primaire spécifique du complexe $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (P12-73) et d'un anticorps secondaire couplé au FITC. La figure 29 montre les résultats obtenus avec en abscisse l'intensité de

RESULTATS

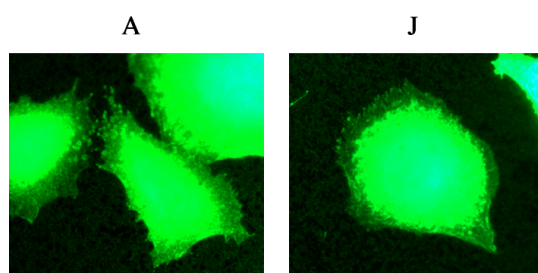


Figure 30: Étude de la localisation subcellulaire des fragments de taline A et J dans les lignées stables établies

La localisation subcellulaire des fragments de taline A et J au sein des cellules des clones A et J, adhérentes sur fibrinogène, a été révélée par immunofluorescence indirecte à l'aide d'un anticorps primaire anti-*myc* et d'un anticorps secondaire, couplé à l'*FITC*.

fluorescence pour le marquage de $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$ et en ordonnée le nombre de cellules comptées. La majorité des cellules de chaque clone exprime l'intégrine $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$, comparés au contrôle négatif en absence d'anticorps primaire (noir). Les cellules du clone A (rouge) semblent exprimer une quantité plus importante de $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$ que les cellules des clones J et C. De plus, alors que l'expression de $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$ à la surface des clones cellulaires A et J est assez homogène, une partie des cellules du clone C (vert) (18% environ) expriment une quantité plus faible de $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$. Néanmoins, ces résultats confirment que l'intégrine $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$ est bien exprimée à la surface cellulaire des clones A, J et C.

B.5. Étude de la localisation subcellulaire des fragments de taline A et J dans les lignées stables établies

Nous avons montré que le fragment taline A, fusionné à DsRed, et le fragment taline J, fusionné à DsRed ou à l'épitope *myc*-His, localisaient dans les AF de cellules CHO $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$ -GFP (Chapitre II Figures 2, 6A et 6C) et que cette localisation correspondait à une interaction *in vitro* des fragments A et J avec β_3 (Chapitre II Figures 3B et 6D). Pour confirmer cette localisation dans les clones cellulaires stables et inductibles, nous avons déterminé la localisation subcellulaire des fragments de taline A et J au sein des cellules des clones A et J, adhérentes sur fibrinogène, par immunofluorescence indirecte comme décrit précédemment. Comme leurs analogues, fusionnés à DsRed, les fragments de taline A et J, fusionnés à l'épitope *myc*-His, localisaient à la périphérie cellulaire dans des adhérences focales (Figure 30). Dans beaucoup de cellules, cette localisation était difficile à observer à cause de la forte expression des fragments après induction, résultant dans un marquage cytoplasmique intense. Néanmoins la localisation des fragments A et J au niveau des AF confirme leur fonctionnalité, suggérant une interaction directe avec β_3 .

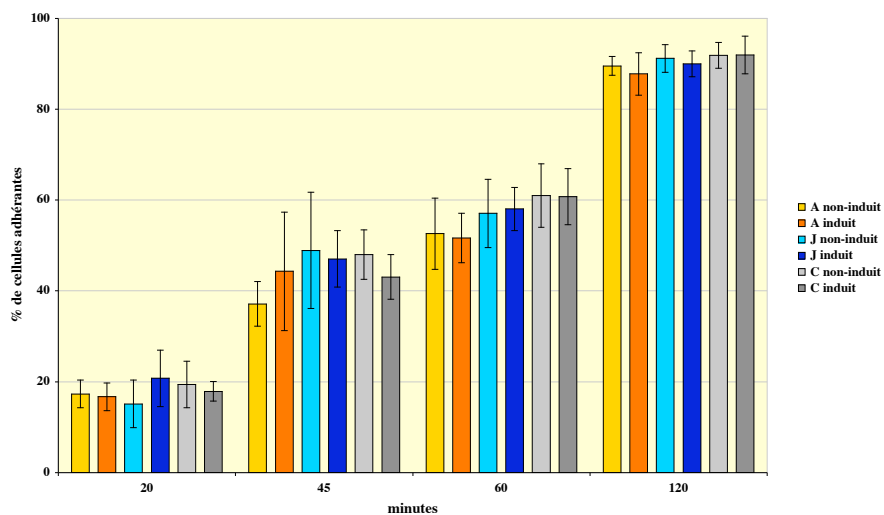


Figure 31: Étude de l'effet produit par les fragments de taline A et J sur l'adhésion et l'étalement des cellules CHO $\alpha_{1b}\beta_3$ sur fibrinogène

La cinétique d'adhésion des cellules des clones A, J et C, en conditions non-induites et induites, a été suivie au microscope à contraste de phase et le nombre de cellules adhérentes a été compté.

B.6. Étude de l'effet produit par les fragments de taline A et J sur l'adhérence et l'étalement des cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$ sur fibrinogène

Pour vérifier l'hypothèse que l'interaction du domaine élongé de la taline avec les intégrines joue un rôle dans l'adhérence et l'étalement cellulaire, nous avons testé si l'induction des fragments de taline A et J dans les clones stables A et J pouvait inhiber l'adhérence et l'étalement des cellules. Les cellules des clones A, J et C ont été incubées pendant la nuit en absence ou en présence de tétracycline (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Les cellules ont alors été détachées gardées en suspension pendant 2 heures et déposées sur des lamelles en verre, recouvertes de fibrinogène. La cinétique de l'adhérence et de l'étalement cellulaire a alors été suivie pendant 3 heures au microscope à contraste de phase et le nombre de cellules étalées a été compté. Nous avons observé que les cellules des trois clones A, J et C, aussi bien en conditions non-induites qu'en conditions induites, étaient capables d'adhérer et de s'étaler sur fibrinogène. La figure 31 montre qu'aucune inhibition de l'étalement cellulaire n'a pu être observée pour les cellules surexprimant le fragment de taline A ou J. Nous avons pu observer qu'en fin d'étalement, les cellules du clone A occupaient une surface plus étendue que les cellules des clones J et C. Néanmoins, ce phénomène était observé aussi bien pour les cellules A induites que pour les cellules A non-induites et pourrait être dû à la quantité de récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ exprimé à la surface cellulaire (voir Figure 29).

C. Conclusion et discussion

Une première approche de l'étude fonctionnelle a consisté à étudier l'attachement et l'étalement de cellules CHO $\alpha_{IIb}\beta_3$, ayant internalisé un peptide synthétique d'une séquence de 12 résidus de la taline, particulièrement conservés au niveau du site d'interaction avec β_3 du domaine élongé. Alors que l'efficacité de l'internalisation du peptide a été démontrée (Figure 23), ce peptide, n'était pas capable de provoquer le détachement des cellules en adhérence (Figure 24A) ou d'inhiber l'étalement des cellules sur fibrinogène (Figure 24B). Pris ensemble avec l'observation que le peptide taline n'est pas localisé dans les AF, ces résultats suggèrent que le choix des 12

RESULTATS

résidus conservés de taline, basé sur une analyse de l'homologie de séquence de la taline de différentes espèces, est trop restrictif et ne contient pas tous les résidus de taline, nécessaires à une interaction *in vivo* avec la partie cytoplasmique de β_3 dans notre système cellulaire. C'est pourquoi nous avons choisi une nouvelle stratégie pour montrer l'implication du domaine élongé de la taline dans le mécanisme d'adhérence cellulaire, c'est-à-dire celle de surexprimer, dans les cellules CHO $\beta_{11b}\beta_3$, les fragments de taline A et J, pour lesquels nous avons démontré une localisation au niveau des AF et une interaction directe avec la partie cytoplasmique de β_3 (Chapitre II). Néanmoins, cette approche ne nous a pas non plus permis de mettre en évidence une inhibition de l'adhérence cellulaire. Ces résultats pourraient s'expliquer de différentes manières. Une première hypothèse serait que les fragments de taline A et J possèdent une affinité plus faible pour β_3 que les domaines globulaires et élongés de la taline endogène et ne peuvent donc pas entrer en compétition avec la taline pour interagir avec β_3 . Dans ce cas, la localisation subcellulaire des fragments A et J au niveau des AF pourrait indiquer que, dans les cellules en adhérence, la taline endogène n'engage pas tous les récepteurs $\beta_{11b}\beta_3$ mais que certains récepteurs sont libres et accessibles aux fragments recombinants de la taline. En ce qui concerne le fragment J, une deuxième hypothèse serait que l'interaction du domaine élongé de la taline avec β_3 n'est pas nécessaire à l'attachement et l'étalement cellulaire. Dans ce cas, le domaine élongé jouerait un rôle dans des processus plus dynamiques en aval de l'étalement cellulaire comme la transduction de forces mécaniques lors de la migration cellulaire.

CONCLUSION ET DISCUSSION FINALE

CONCLUSION ET DISCUSSION FINALE

La taline est une protéine cytosolique impliquée dans la connexion des intégrines au cytosquelette et ses nombreux domaines fonctionnels et sites d'interaction pour les intégrines, l'actine, la vinculine et la protéine TES soulignent son rôle multifonctionnel. Pour délimiter précisément un site d'interaction avec les intégrines au niveau du domaine élongé de la taline, nous avons choisi une approche cellulaire particulière. L'étude de la localisation subcellulaire de fragments recombinants de la taline, fusionnés à DsRed, dans les cellules CHO $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -GFP nous a permis de délimiter le site d'interaction avec β_3 à une séquence de 42 acides aminés (résidus 2072 à 2113), compris entre un site d'interaction avec la vinculine (résidus 1944 à 1969) et le site C-terminal d'interaction avec l'actine (résidus 2345 à 2541). Néanmoins, l'observation au microscope à fluorescence des différents fragments recombinants peut être, dans certains cas, délicate puisque la forte surexpression des fragments recombinants pourrait masquer des localisations spécifiques. C'est pourquoi nous avons focalisé, lors de l'observation, essentiellement sur des cellules exprimant faiblement les fragments recombinants.

Le choix des protéines fluorescentes GFP et DsRed nous a permis d'étudier le transfert par résonance d'énergie de fluorescence entre β_3 -GFP et les fragments de taline, fusionnés à DsRed. En effet, les spectres d'émission du couple GFP/DsRed sont bien séparés et, comme la DsRed est excitée à une longueur d'onde de 568 nm, en dehors du spectre d'excitation de GFP, nous avons pu utiliser une technique qui consiste à mesurer l'intensité du donneur (GFP) avant et après photodestruction de l'accepteur (DsRed) (Bastiaens & Jovin, 1996; Wouters et al., 1998). La distance de Förster R_0 du couple GFP/DsRed, qui représente la distance entre les deux molécules pour laquelle l'efficacité de FRET (en conditions optimales) est de 50%, est de 5,7 nm (Erickson et al., 2003), comparable à la valeur R_0 du couple modèle CFP/YFP pour l'étude de FRET (Miyawaki et al., 1997; Patterson et al., 2000). Comme l'efficacité de FRET est inversement proportionnelle à la sixième puissance de la distance qui sépare les deux protéines fluorescentes, l'observation de FRET entre DsRed, fusionné

au fragment de taline G, et β_3 -GFP démontre que les deux protéines se trouvent à une distance extrêmement réduite l'une de l'autre, impliquant la quasi certitude d'une interaction directe. Le choix de cette approche cellulaire nous a donc permis de confirmer *in vivo* l'interaction du domaine élongé de la taline avec β_3 et de souligner l'importance physiologique de cette interaction.

Le domaine élongé de la taline ne possède aucune homologie de séquence avec le domaine FERM du domaine globulaire de la taline, dont l'interaction avec la partie cytoplasmique des intégrines a déjà été caractérisée, suggérant un mécanisme d'interaction propre au domaine élongé (Garcia-Alvarez et al., 2003). Or, le domaine élongé de la taline est composé essentiellement de motifs répétés, riches en alanines, adoptant une structure α -hélicoïdale (McLachlan et al., 1994). Une étude structurale récente a montré que les sites d'interaction avec la vinculine, correspondant chacun à un tel motif, sont des sites cryptiques, pouvant être exposés par un changement conformationnel (Papagrigoriou et al., 2004). Lors des expériences de SPR, menées pour confirmer l'interaction directe *in vitro* du domaine élongé avec β_3 , nous avons mesuré une constante d'association très faible entre le fragment de taline G (résidus 1984 à 2344) et la partie cytoplasmique de β_3 , suggérant la nécessité d'un changement conformationnel au niveau du fragment G ou de β_3 . De plus, nous avons délimité la séquence minimale d'interaction avec β_3 aux résidus 2072 à 2113 de la taline qui correspondent exactement au 51^{ème} motif répété (résidus 2080 à 2113) identifié au niveau du domaine élongé (McLachlan et al., 1994). Pris ensemble, ces observations pourraient suggérer un masquage du site d'interaction avec β_3 au niveau du domaine élongé de la taline, nécessitant, comme les sites d'interaction avec la vinculine, une activation conformationnelle.

Le rôle fonctionnel du domaine globulaire de la taline est bien élucidé. En effet le domaine globulaire peut activer les intégrines en interagissant avec la partie cytoplasmique de différentes sous-unités β (Calderwood, 2004b). Ce mécanisme semble constituer une dernière étape assez générale dans la signalisation inside-out et différentes régulations commencent à être décrites pour ce mécanisme. Ainsi la PIPK I_β (Di Paolo et al., 2002; Ling et al., 2002; Barsukov et al., 2003; Ling et al., 2003) et

l'ICAP-1 (Chang et al., 2002; Bouvard et al., 2003) peuvent se lier au domaine globulaire de la taline ou à la partie cytoplasmique de la sous-unité β respectivement, inhibant l'interaction du domaine globulaire avec l'intégrine. D'un autre côté, la production locale de PIP_2 par la PIPK $\text{I}\beta$ a un effet activateur sur l'interaction de la taline avec l'intégrine (Martel et al., 2001). Le clivage, par la calpaine, de la taline ou de la partie cytoplasmique des sous-unités β et la phosphorylation des parties cytoplasmiques des intégrines constituent d'autres mécanismes de régulation de cette dernière étape dans la signalisation inside-out (Johansson et al., 1994; Sakai et al., 2001; Yan et al., 2001; Datta et al., 2002). Néanmoins, le fonctionnement exact de ces mécanismes ainsi que les cascades de signalisation précédant l'activation de l'intégrine restent pour le moment inconnus.

Le clivage de la taline par la calpaine en ses domaines globulaires et élongés augmente l'affinité du domaine globulaire pour les intégrines (Yan et al., 2001). Or, des études de la taline dans les cellules CHO ont montré que la taline entière est présente dans les AF, dans lesquelles l'intégrine est dans son état activé, et que le clivage de la taline semble nécessaire à la dissociation des AF (Tranqui & Block, 1995; Franco et al., 2004). La stabilité relative des fragments globulaires et élongés dans les cellules (Yan et al., 2001; Calderwood et al., 2002; Tadokoro et al., 2003) suggère que le clivage de la taline par la calpaine constitue un mécanisme de régulation et non pas un simple mécanisme de dégradation et que les domaines globulaires et élongés ont chacun leur propre rôle fonctionnel. Pris ensemble avec l'observation que le domaine globulaire de la taline, contrairement au domaine élongé, localise difficilement avec les intégrines dans des AF matures (O'Halloran et al., 1985), ces résultats suggèrent un rôle fonctionnel du domaine élongé dans la signalisation outside-in plutôt que dans la signalisation inside-out. Cette hypothèse est renforcée par nos résultats, montrant que la surexpression du fragment G du domaine élongé de la taline, contenant le site d'interaction avec β_3 , n'a aucun effet sur l'état d'activation de l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$.

Alors que le domaine globulaire isolé de la taline suffit pour activer les intégrines et assurer le rôle de la taline dans la signalisation inside-out (Tranqui & Block, 1995;

Calderwood et al., 2002; Tadokoro et al., 2003; Franco et al., 2004), l'étude du clone stable, surexprimant le site d'interaction avec α_3 du domaine élongé de la taline (fragment J), ne nous a pas permis de mettre en évidence un effet inhibiteur sur l'adhérence et l'étalement des cellules CHO $\alpha_{11b}\alpha_3$, dû à une compétition entre le fragment recombinant et le domaine élongé endogène (Figure 31). Or le site d'interaction avec α_3 , porté par ce fragment, semble fonctionnel et capable d'interagir avec l'intégrine comme le démontre sa localisation subcellulaire au niveau des AF (Figure 30). Ceci pourrait suggérer que soit l'affinité du fragment recombinant pour l'intégrine n'est pas suffisante pour entrer en compétition avec la taline endogène, soit l'interaction du domaine élongé de la taline avec l'intégrine n'est pas indispensable à l'attachement et l'étalement cellulaire, pendant lequel la taline ne semble pas encore clivée (Franco 2004 [Franqui 1995 217]). Dans ce cas, la connexion des intégrines au cytosquelette pourrait être assurée par l'interaction du domaine globulaire avec les intégrines et l'interaction du domaine élongé avec l'actine. Il serait donc concevable qu'après clivage de la taline par la calpaine, le domaine élongé isolé assure la connexion des intégrines au cytosquelette dans des mécanismes plus dynamiques comme la migration cellulaire ou la transduction de forces de la MEC vers le cytosquelette d'actine. L'étude de domaines globulaires et élongés recombinants de la taline dans des cellules délétées du gène de la taline devrait permettre d'étudier cette hypothèse.

MATERIELS
ET
METHODES

MATERIELS ET METHODES

A. Méthodes de biologie cellulaire

A.1. Culture des cellules CHO

Les cellules CHO sont cultivées dans du milieu de culture IMDM (Isocove's modified Dulbecco's medium), additionné de 10% de SVF (sérum de veau foetal) décomplémenté, de L-glutamine à une concentration finale de 2 mM, de pénicilline (100 U/mL) et de streptomycine (100 µg/mL). Ce milieu est appelé IMDM complet. Les cellules sont cultivées dans des flacons de culture à 37°C dans une atmosphère saturée d'eau en présence de 5% de CO₂. Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont détachées, lavées et remises en culture à une dilution 1/10.

A.2. Détachement et numération des cellules CHO

Le surnageant des cellules est aspiré et les cellules sont détachées par incubation pendant 10 minutes à 37°C en présence de tampon Versène (Hepes 50 mM, NaCl 126 mM, KCl 5 mM, EDTA 1mM, pH 7,4). Les cellules détachées sont lavées dans du milieu IMDM et centrifugées pendant 10 minutes à 1000 rpm à 4°C. La numération des cellules est réalisée à l'aide d'une cellule de «Neubauer» en présence de bleu Trypan à 0,2 %, un colorant d'exclusion permettant de colorer les cellules mortes.

A.3. Congélation des cellules CHO

Les cellules sont détachées, lavées et comptées. Après une centrifugation additionnelle, le culot cellulaire est repris dans du milieu de congélation (SVF 90 %, DMSO 10 %) à raison de 5·10⁶ cellules/mL. Cette suspension cellulaire est transférée dans des cryotubes à raison de 500 µL par tube, congelée à -80°C et transférée après 24 heures dans de l'azote liquide (-160°C).

A.4. Transfection transitoire de cellules CHO

Pour la transfection transitoire d'ADN plasmidique dans les cellules CHO, la technique à la lipofectamine a été utilisée. La lipofectamine est un lipide cationique possédant des chaînes aliphatiques et des groupements amine, chargés positivement. En milieu aqueux, ce lipide cationique forme des liposomes qui interagissent par des forces électrostatiques avec les groupements phosphate à charge négative de l'ADN plasmidique, favorisant ainsi son passage à travers les membranes plasmiques et nucléaires. Une fois dans le noyau de la cellule, l'ADN plasmidique peut être intégré

dans le génome cellulaire (Felgner et al., 1987; Gareis et al., 1991; Gershon et al., 1993; Smith et al., 1993).

Pour la transfection, 750.000 cellules sont mises en culture dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre. Lorsque les cellules atteignent une confluence de 50 %, elles sont prêtes pour la transfection. Deux solutions sont préparées. Solution 1□ contient la quantité de lipofectamine nécessaire (10-20 □L) dans un volume final de 100 □L de IMDM. Solution 2□ contient la quantité d'ADN plasmidique nécessaire (5-20 □g) dans un volume final de 100 □L de IMDM. La solution 2 est transférée lentement dans la solution 1 et le mélange est incubé pendant 30 minutes à température ambiante pour permettre la formation des complexes lipofectamine/ADN. Pendant ce temps les cellules sont lavées deux fois avec du IMDM. Finalement le mélange lipofectamine/ADN est repris dans 2 mL de milieu IMDM et distribué de manière homogène sur les cellules. Après 5 heures d'incubation à 37°C, 1,5 mL de milieu IMDM sont rajoutés pour éviter le dessèchement des cellules. 24 heures après la transfection, le surnageant des cellules est aspiré doucement et remplacé par du milieu de culture IMDM complet. Enfin, 48 heures après transfection les cellules sont prêtes pour l'analyse de l'expression du gène transfecté.

A.5. Adhérence des cellules sur fibrinogène

Des cellules en phase exponentielle de croissance sont détachées, lavées et comptées. Elles sont ensuite transférées dans des boîtes de 6 puits contenant des lamelles de microscopie recouvertes de fibrinogène. Ces lamelles ont été préincubées pendant la nuit à 4°C avec du fibrinogène à 20 □g/mL, dilué dans du milieu IMDM, et lavées deux fois à l'IMDM avant l'addition des cellules. L'adhérence des cellules se fait à 37°C et le temps nécessaire à l'étalement complet des cellules peut varier de 1 à 5 heures selon la lignée cellulaire et l'état des cellules.

A.6. Immunofluorescence intracellulaire indirecte et directe

L'immunofluorescence indirecte permet de déterminer la localisation cellulaire d'une protéine d'intérêt à l'aide d'un anticorps spécifique (anticorps primaire). La fixation de l'anticorps primaire est détectée grâce à un anticorps secondaire, couplé à un marqueur fluorescent comme l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, vert) ou de tetramethylrhodamine (TRITC, rouge).

Des cellules adhérentes sur lamelles de microscopie recouvertes de fibrinogène sont lavées au PBS, puis fixées pendant 15 minutes à 4°C dans du tampon de fixation (PBS pH 7,4, paraformaldéhyde 3 %, sucrose 2 %). Ensuite, elles sont lavées 3 fois pendant 15 minutes à température ambiante dans du tampon de lavage (PBS pH 7,4, BSA 0,5 %, Triton X-100 0,5 %). Le Triton X-100 rend les protéines intracellulaires accessibles par perméabilisation de la membrane plasmique et la BSA sature les sites aspécifiques. Le marquage immunofluorescent est réalisé en incubant les cellules pendant 30 minutes à température ambiante en présence de 100 □L d'anticorps primaire et pendant 40 minutes en présence de l'anticoprs secondaire. Après chaque incubation, l'excès d'anticorps est éliminé par 3 lavages de 15 minutes dans du

tampon de lavage. Finalement, les cellules sur lamelles sont montées sur une lame à microscopie dans du Mowiol 40-88/DABCO (Sigma)

Pour l'immunofluorescence directe des protéines de fusion auto fluorescentes (GFP, DsRed), transfectées au préalable dans les cellules, les cellules étalées sur lamelles recouvertes de fibrinogène sont lavées au PBS, fixées comme décrit précédemment et lavées 3 fois pendant 15 minutes dans du tampon de lavage avant d'être montées sur lames de microscopie dans du Mowiol/Dabco.

A.7. Observation au microscope à fluorescence

L'observation au microscope à fluorescence a été réalisée à l'aide d'un microscope LEICA Leitz DMRB et d'un objectif 63x à immersion dans l'huile. Des photos ont été acquises à l'aide d'une caméra numérique LEICA DC 300F et du logiciel LEICA IM1000 1.20. Les photos ont été traitées par la suite avec Photoshop 6.0 (Adobe Systems).

Pour les expériences de FRET, un microscope confocal à balayage laser (Bio-Rad 1024) a été utilisé avec comme source d'excitation un laser krypton-argon. Les images ont été acquises à l'aide d'une caméra Nikon Eclipsa TE300 et d'un objectif 40x à immersion dans l'huile (CFI Plan-Fluor, ouverture numérique 1.3). Les images acquises ont été traitées à l'aide du logiciel Amira (TGS).

B. Méthodes de biologie moléculaire

B.1. Amplification d'ADN par PCR (polymerase chain reaction)

La technique de PCR (Saiki et al., 1985), permet d'amplifier une séquence d'ADN *in vitro* à partir d'une matrice d'ADN et d'une amorce complémentaire à la matrice. Cette technique utilise les propriétés particulières d'une DNA polymérase, isolée à partir de *Thermophilus aquaticus*, qui est particulièrement stable à des hautes températures.

Pour amplifier une séquence d'ADN par la technique de la PCR, deux amorces synthétiques sont choisies de manière à ce qu'elles puissent s'hybrider à chacun des deux brins de la matrice, de part et d'autre de la séquence à amplifier. Plusieurs cycles de réplication successifs permettent alors la multiplication spécifique de la séquence choisie. Chaque cycle se compose de 3 étapes, correspondant à trois températures différentes

Dénaturation □ à 95°C l'ADN double brin est dénaturé en ADN simple brin.

Hybridation □ à 50°C les deux amorces peuvent s'hybrider à l'ADN simple brin.

Elongation □ à 72°C l'ADN polymérase synthétise les brins complémentaires aux brins matrice en démarrant la synthèse au niveau des 3'OH libres des amorces.

Les réactions de PCR sont réalisées suivant le protocole du kit utilisé (PCR kit Ver.2.1, TaKaRa Biomedicals) □

Réactif	Explication	Quantité
ADN	Matrice	500 ng
Tampon PCR10x	Tris-Hcl 100mM (pH 8,3) KCl 500mM MgCl ₂ 15mM	8 μ L
dNTP mix	Mélange des 4 nucléotides (2,5 mM chacun)	2 μ L
Amorce sens	Amorce spécifique de l'extrémité 5' de la matrice	20 pmol
Amorce reverse	Amorce spécifique de l'extrémité 3' de la matrice	20 pmol
TaKaRa Taq	DNA polymérase (5 unités/ μ L)	0,5 μ L
dH ₂ O	Eau distillée	qsp 80 μ L

Ce mélange est amené à 95°C pendant 5 minutes pour permettre la séparation des deux brins complémentaires de la matrice. Ensuite, 20 à 25 cycles d'amplification sont réalisés comme suit : 60 secondes à 95°C, 90 secondes à 56°C, 120 secondes à 72°C. À la fin du dernier cycle, l'échantillon est amené pendant 7 minutes à 72°C. Cette étape est appelée postélongation et permet de terminer l'élongation de tous les fragments incomplets. L'efficacité de la réaction est évaluée sur 10 μ L de l'échantillon par électrophorèse en gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium (BET).

B.2. Extraction d'ARNm à partir de cellules HEL

Les ARN totaux sont extraits de cellules HEL selon le protocole de Chomczynski & Sacchi (1987) à l'aide d'une solution dénaturante contenant un détergent (N-laurylsarcosine), un agent dissociant (thiocyanate de guanidinium) et un agent réducteur (β -mercaptoéthanol) et une solution tamponnée (citrate) afin d'inhiber les RNases endogènes, de dénaturer les acides nucléiques et de précipiter les protéines (Chomczynski & Sacchi, 1987). Les cellules HEL ($8 \cdot 10^6$) sont reprises dans 500 μ L de solution dénaturante (citrate de Na 25 mM, thiocyanate de guanidinium 4 M, β -mercaptoéthanol 100 mM, N-laurylsarcosine 0,5 %), 50 μ L d'acétate de Na 2 M (pH 4), 500 μ L de phénol saturé et 100 μ L de chloroforme/isoamylalcool (49/1). Ainsi les protéines et l'ADN génomique sont précipités à l'interface de la phase organique et de la phase aqueuse, tandis que l'ARN est retrouvé dans la phase aqueuse (supérieure). L'ARN de la phase aqueuse est ensuite lavé avec 500 μ L de chloroforme/isoamylalcool, précipité par 500 μ L d'isopropanol à -20°C, séché, puis repris dans 100 μ L d'eau distillée et dosé à 260 nm.

B.3. RT-PCR : Amplification *in vitro* d'ADNc à partir de ARNm

La RT-PCR se fait en deux étapes : Dans un premier temps une transcriptase inverse (ou reverse transcriptase) rétrovirale est utilisée pour retranscrire la matrice d'ARN en brin d'ADN complémentaire par élongation d'une amorce spécifique du côté 3' de la matrice. Dans un deuxième temps, le brin d'ADNc ainsi synthétisé sert de matrice à l'amplification par PCR classique. L'étape de transcription inverse est réalisée suivant le protocole fourni par le kit utilisé (RT-PCR kit Ver.2.1, TaKaRa Biomedicals) :

Réactif	Explication	Quantité
ARN cellulaire	Extrait de cellules HEL	1 μ g
Tampon PCR 10x		2 μ L
dNTP mix	Mélange des 4 nucléotides 10 mM chacun	2 μ L
MgCl ₂ 25mM		4 μ L
Amorce reverse	Spécifique du côté 3' du fragment à amplifier	20 pmol
dH ₂ O	RNase free	qsp 18,5 μ L

Le mélange est incubé pendant 10 minutes à 60°C pour permettre une linéarisation de l'ARN en brisant la structure secondaire. La transcription inverse est alors effectuée pendant 1 heure à 42°C après ajout de 1 μ L de transcriptase inverse (5 unités/ μ L) et 0,5 μ L d'inhibiteurs de RNases (40 unités/ μ L). La transcriptase inverse est inactivée par chauffage à 99°C pendant 5 minutes et l'ADNc ainsi obtenu est soumis à une réaction de PCR classique.

Réactif	Explication	Quantité
Mélange du cycle de RT	Contient déjà l'amorce reverse	20 μ L
Tampon PCR 10x		8 μ L
MgCl ₂ 25mM		2 μ L
Amorce sens	Spécifique du côté 5' du fragment à amplifier	20 pmol
TaKaRa Taq	DNA polymérase (5 unités/ μ L)	1 μ L
dH ₂ O		qsp 100 μ L

Les cycles de PCR sont réalisés comme décrit dans le paragraphe PCR et le résultat obtenu est analysé sur 10 μ L de l'échantillon en gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium.

B.4. Sous-clonage d'un ADNc dans un vecteur plasmidique

B.4.1. Restriction enzymatique

Les enzymes de restriction sont des endonucléases capables de cliver l'ADN double brin de manière spécifique au niveau de séquences palindromiques. La réaction de restriction se fait par incubation pendant 2 heures à une température et dans un milieu tamponné spécifiques de l'enzyme en question.

Réactif	Quantité
ADN	5 μ g
Tampon de restriction 10x	5 μ L
Enzyme de restriction	20 unités
dH ₂ O	qsp 50 μ L

Après restriction la totalité de l'échantillon est purifiée par électrophorèse en gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium.

B.4.2. Électrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose permet la séparation de fragments linéaires d'ADN en fonction de leur taille par migration dans un champ électrique. La concentration en agarose du gel varie de 0,6 à 2 % en fonction de la taille des fragments à séparer. L'agarose est dissoute à chaud dans du tampon TBE (Tris 90 mM, acide borique 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8). Du bromure d'éthidium, un colorant s'intercalant entre les paires de bases de l'ADN double brin, est ajouté à une concentration finale de 0,5 µg/mL avant de couler le gel (~50°C). La migration se fait dans du TBE à une tension constante de 130 V pendant une heure environ. Les fragments d'ADN sont alors visualisés sous lumière UV (λ=312 nm) grâce à la fluorescence émise par le bromure d'éthidium. La taille des fragments est estimée à l'aide d'un mélange de marqueurs de tailles connues (1Kb+, GibcoBRL).

B.4.3. Éluion des fragments d'ADN du gel d'agarose et purification sur membrane au gel de silicate

La purification d'un fragment d'ADN isolé dans un gel d'agarose est réalisée à l'aide d'un kit «QIAquick gel extraction kit», qui se sert d'une colonne d'affinité possédant une membrane au gel de silicate. À pH inférieur à 7,5 et à des hautes concentrations en sels, l'ADN se lie à cette membrane alors que les contaminants ne sont pas retenus. Après lavage de la colonne, le DNA est élué par un tampon à faible concentration saline ou par de l'eau.

La bande d'ADN à purifier est excisée du gel d'agarose et solubilisée dans le tampon de solubilisation à haute concentration saline (pH<7,5, fourni par le kit) par chauffage à 50°C pendant 10 minutes. L'ADN dissout est déposé sur la colonne par centrifugation pendant 1 minute à 13000 rpm. Après plusieurs étapes de lavages, l'ADN est élué avec 50-100 µL d'eau distillée.

B.4.4. Déphosphorylation du vecteur linéarisé et purifié

Un vecteur plasmidique, linéarisé par restriction enzymatique, peut se recirculariser au niveau de ses extrémités cohésives au moment de la ligation. Pour éviter ce phénomène, le vecteur est déphosphorylé aux extrémités 5' par l'action de la phosphatase alcaline bovine (CIP) comme suit

Réactif	Quantité
ADN linéaire	jusqu'à 5 µg
Tampon de réaction	5 µL
CIP	10 unités
dH ₂ O	qsp 50 µL

Ce mélange est incubé pendant 1 heure à 37°C et la phosphatase alcaline est éliminée immédiatement par purification de l'ADN déphosphorylé sur membrane au gel de silicate.

B.4.5. Ligation d'un fragment d'ADN dans le vecteur plasmidique

La ligation d'un insert dans son vecteur nécessite l'action de la T4 ADN ligase, une enzyme extraite du bactériophage T4. En présence d'ATP, cette enzyme catalyse la formation de liaisons phosphodiester entre une extrémité 3' hydroxile et une extrémité 5' phosphate de deux fragments d'ADN. La réaction se fait à 16°C pendant la nuit

Réactif	Quantité
Vecteur	~100 ng
Insert	~50-300 ng
Tampon de ligation 10x (contient ATP)	2 μ L
T4 ADN ligase	1 unité
dH ₂ O	qsp 20 μ L

en fonction du rapport des tailles Insert/Vecteur

La quantité d'insert à utiliser est déterminée par le rapport molaire insert/vecteur. Plus l'insert est petit par rapport au vecteur, plus la quantité d'insert à utiliser est grande. 10 μ L du mélange de ligation sont utilisés pour transformer des bactéries compétentes.

B.4.6. Souches bactériennes utilisées

Les souches de bactéries *Escherichia coli* utilisées sont les suivantes

- DH5[F'] F', *endAI*, *hsdR17* (r_K^- , m_K^+), *supE44*, *thi-1*, Δ , *recAI*, *gyrA*, *relAI*, Δ 80*dlacZ* M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169
- JM109 *endAI*, *recAI*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (r_K^- , m_K^+), *relAI*, *supE44*, Δ , Δ (*lac-proAB*), [F', *traD36*, *proA*⁺*B*⁺, *lacI*^qZ M15]
- BL21(DE3) [F' *omp T*, *hsd S*, (r_B^- , m_B^-) gal] pLysS

B.4.7. Préparation de bactéries compétentes et transformation par un plasmide

Pour pouvoir incorporer un ADN étranger, les bactéries sont rendues compétentes par un protocole modifié de Chung *et al.* (1989) (Chung et al., 1989). Une colonie des bactéries utilisées est mise en culture pendant la nuit à 37°C sous agitation dans du milieu LB (Tryptone 10 g/L, extraits de levure 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7,4). Le lendemain 0,5 mL de cette préculture sont inoculés à 50 mL de LB. Après 3 à 4 heures sous agitation à 37°C, lorsque la culture atteint une DO à 600nm de 0,4 à 0,5, les bactéries se trouvent en phase exponentielle de croissance. Elles sont alors précipitées à 4°C par 15 minutes de centrifugation à 2500 g et reprises dans 5 mL de milieu TSS glacé (tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 5 g/L, polyéthylène glycol 10%, diméthylsulfoxyde 5%, MgCl₂ 50 mM, pH 6,5). Le polyéthylène glycol est un détergent qui fragilise la membrane bactérienne et rend les bactéries ainsi compétentes pour la transformation. 300 μ L de bactéries compétentes sont incubées pendant 30 minutes à 4°C en présence de 500 ng d'ADN plasmidique à transformer.

Un choc thermique, qui permet à l'ADN de traverser la paroi bactérienne fragilisée, est infligé aux bactéries par incubation pendant 90 secondes à 42°C. Les bactéries sont immédiatement remises sur glace et 1 mL de milieu LB est rajouté. Ensuite, les bactéries sont incubées pendant 1 heure sous agitation à 37°C pour permettre l'expression du gène de résistance porté par le plasmide. Une centrifugation de 30 secondes à 10000 rpm permet de reprendre les bactéries dans 100 μ L de milieu LB et de les étaler en boîte de Pétri sur un milieu LB gélosé (agar 15 g/L) contenant l'antibiotique de sélection (ampicilline 100 μ L/mL ou kanamycine 50 μ L/mL). Les boîtes de Pétri sont incubées pendant la nuit à 37°C. Seules les bactéries ayant incorporé le plasmide et exprimant par conséquent la résistance à l'antibiotique auront formé des colonies.

B.4.8. PCR sur colonies bactériennes

Pour vérifier que les clones bactériens résistant à l'antibiotique portent l'ADN plasmidique avec l'insert, 10 à 20 colonies sont soumises à une PCR. Un petit nombre de bactéries de chaque colonie est transféré dans un tube PCR à l'aide d'un cône de micropipette stérile. Ensuite, ces bactéries sont soumises à une réaction de PCR classique, pour amplifier l'insert porté par le vecteur à l'aide des amorces correspondantes. 10 μ L de produit de PCR sont analysés pour chaque colonie en gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium.

B.4.9. Préparation de grandes quantités d'ADN plasmidique (Maxiprep)

La préparation d'ADN plasmidique est réalisée grâce à un kit de purification (QIAfilter Plasmid Maxi Kit, GIAGEN) qui repose sur le principe de la séparation de l'ADN plasmidique de l'ADN génomique par lyse alcaline (Birnboim & Doly, 1979). Les bactéries sont lysées en milieu alcalin en présence d'un détergent (SDS), puis le lysat est neutralisé par de l'acétate. L'ADN génomique précipite, alors que l'ADN plasmidique reste soluble et peut être purifié par chromatographie sur résine échangeuse d'anions.

Une colonie, résistante à l'antibiotique, est inoculée dans 4 mL de milieu sélectif (milieu LB + antibiotique) pendant 8 heures à 37°C sous agitation. Cette pré-culture sert d'inoculum à une culture de 400 mL de milieu sélectif qui se fera pendant la nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain, les bactéries sont centrifugées à 4°C pendant 15 minutes à 3000 g et repris dans 10 mL de tampon P1 (tampon de resuspension, Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, RNase A 100 μ g/mL). 10 mL de tampon P2 (tampon de lyse, NaOH 200 mM, SDS 1 %) sont rajoutés, le mélange est homogénéisé doucement par retournement et incubé pendant 5 minutes à température ambiante. Puis 10 mL de tampon P3 glacé (tampon de neutralisation, acétate de K 3 M, pH 5,5) sont rajoutés, l'ensemble est mélangé, versé dans la seringue de filtration fournie par le kit et laissé décanter pendant 10 minutes. Pendant ce temps l'ADN génomique précipité s'accumule à la surface du lysat qui peut alors être filtré et déposé sur la colonne échangeuse d'anions, équilibrée au préalable avec 10 mL de solution QBT (tampon d'équilibrage, NaCl 750 mM, MOPS 50 mM, pH 7,0, isopropanol 15 %,

Triton X-100 0,15 %). La colonne est alors lavée deux fois avec 30 mL de tampon QC (tampon de lavage, NaCl 1 M, MOPS 50 mM, pH 7,0, isopropanol 15 %) et l'ADN est élué avec 15 mL de tampon QF (tampon d'éluion, NaCl 1,25 M, Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, isopropanol 15 %). L'ADN est précipité par addition de 10,5 mL d'isopropanol et centrifugé à 4°C pendant 45 minutes à 9000 g. Le culot d'ADN est lavé, sans être remis en suspension, avec 5 mL d'éthanol à 70 % froid et centrifugé pendant 15 minutes. Le culot est alors séché à l'air ambiant pendant 30 minutes, repris dans 1,6 mL d'eau distillée, répartis dans 4 tubes eppendorf et précipité dans chaque tube par addition de 160 μ L d'acétate de Na 3 M (pH 5,2) et de 1 mL d'éthanol froid à 100 %. Après récupération de l'ADN par centrifugation, il est rincé avec de l'éthanol froid à 70 %, séché sous vide, repris dans 500 μ L d'eau distillée et dosé dans une cuve en quartz à 260 nm.

B.4.10. Séquençage automatique

Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage automatique (DNA Sequencing Kit, Big Dye™ Terminator v3.0 Cycle Sequencing, Applied Biosystems) selon les indications du fournisseur. 400 ng d'ADN plasmidique ont été mélangés à 3 μ L de mélange de séquençage (Terminator Ready Reaction Mix) et 3,2 pmol de l'amorce utilisée dans un volume final de 20 μ L. Le mélange a été soumis à une réaction de PCR (25 cycles \square 10 secondes de dénaturation à 96°C, 5 secondes à 50°C pour l'hybridation de l'amorce, 4 minutes d'élongation à 60°C). Lors de cette réaction, l'ADN de la construction est amplifié et des nucléotides fluorescents, modifiés chimiquement de manière à arrêter l'élongation, sont incorporés à différents endroits dans les brins synthétisés. L'ADN ainsi obtenu a été précipité pendant 15 minutes à l'éthanol (75 %), centrifugé pendant 20 minutes à 13000 rpm et le culot a été séché dans un évaporateur rotatif sous vide. Chaque culot d'ADN a été repris dans 20 μ L de TSR, chauffé pendant 2 minutes à 95°C et analysé à l'aide d'un séquenceur automatique (Applied Biosystems ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer). Les résultats obtenus ont été analysés à l'aide du programme Chromas v1.45 (Technelysium Pty Ltd).

C. Méthodes de biochimie

C.1. Lyse des plaquettes sanguines

Les concentrés plaquettaires périmés ont été mis à notre disposition par le Dr J.-Cl. Faber du Centre de Transfusion Sanguine de la Croix Rouge Luxembourgeoise. Toutes les étapes, jusqu'à la lyse se déroulent à température ambiante et avec de la vaisselle en plastique, afin d'éviter l'activation des plaquettes par le verre. Pour empêcher la coagulation des plaquettes sanguines, neuf volumes de concentrés plaquettaires ont été mélangés à 1 volume d'un tampon anticoagulant (acide citrique 40 mM, citrate trisodique 60 mM, glucose 80 mM) et les hématies contenues dans le concentré ont été éliminées par une centrifugation pendant 10 minutes à 360 g. Les plaquettes, contenues dans le surnageant, ont alors été lavées deux fois par

centrifugation à 1000 g pendant 40 minutes. Le premier lavage a été réalisé dans un tampon citrate à pH 6,5 (citrate de sodium 130 mM, NaCl 12 mM, glucose 30 mM) et le deuxième lavage dans un tampon tris à pH 6,5 (tris 10 mM, EDTA 5 mM, NaCl 155 mM). Les plaquettes ont été reprises dans le tampon de lyse glacé (Tris 50 mM, EDTA 2 mM, DTT 0,5 mM, triton X-100 0,5 %, pH 9), additionné d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (Complete+EDTA, Boehringer), et le lysat plaquettaire a été clarifié par une centrifugation de 10 minutes à 8000 g (4°C), suivie d'une ultracentrifugation d'une heure à 75000 g (4°C).

C.2. Purification de la taline entière et de son domaine élongé à partir de lysat plaquettaire

La taline humaine et son domaine élongé ont été purifiés selon un protocole modifié d'après Turner & Burrige (1989) par chromatographie échangeuse d'anions sur une colonne UNO Q12 (Sigma, volume 12 mL). Un volume de lysat plaquettaire a été mélangé à un volume de tampon d'équilibrage de la colonne (tris 20 mM pH 7,6, NaCl 10 mM, EDTA 3 mM, azide de sodium 0,02%, DTT 0,1 mM) et 5 mL de ce mélange ont été déposés sur la colonne, qui a ensuite été lavée avec du tampon d'équilibrage jusqu'à ce que la densité optique à 280 nm de l'effluent devienne équivalente à la densité optique du tampon d'équilibrage. Les protéines retenues sur la colonne ont alors été éluées avec un gradient de NaCl, allant de 10 à 400 mM, dilué dans le tampon d'équilibrage. L'éluat a été recueilli en fractions de 3 mL, qui ont par la suite été analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide et par Western blot.

C.3. Purification des protéines de fusion avec GST à partir de lysat bactérien

Les protéines de fusion avec GST ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur une résine de glutathion-Sépharose 4B. Des bactéries transformées avec les différentes constructions ont été lysées après induction à l'IPTG par sonication dans le tampon de lyse (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8), additionné de lysozyme (2 mg/mL) et DNase (100 µg/mL) et d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (Complete+EDTA, Boehringer) et le lysat a été clarifié par centrifugation pendant 45 minutes à 10000 rpm et 4°C. 600 µL de lysat bactérien ont été incubés pendant 1 heure à 4°C en présence de 80 µL de résine, prééquilibrée dans du tampon de lavage (PBS 10 mM pH 7,3, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM). La résine a été lavée 5 fois pendant 15 minutes avec 1 mL de tampon de lavage (centrifugation pendant 10 minutes à 4°C et 500 g). Finalement, les protéines retenues sur la résine ont été éluées avec 100 µL de tampon d'éluion (Tris 50 mM pH 8, glutathion réduit 10 mM), dialysées contre du PBS, dosées et analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

C.4. ELISA (enzyme linked immunsorbant assay)

Les expériences en ELISA ont été réalisées dans des plaques de 96 puits (Costar High Bind, Corning Inc.). La taline entière (400 ng/puits) ou le domaine élongé de la taline (300 ng/puits) ont été fixés dans les puits par une incubation pendant la nuit à 4°C dans 100 μ L de tampon carbonate (50 mM, pH 9,6) et les puits ont été saturés pendant 3 heures à 37°C avec 200 μ L de tampon de saturation (PBS, BSA 1 %). Les protéines GST et GST- α_3 , diluées dans 100 μ L de tampon de saturation, ont été rajoutées dans les différents puits et incubées pendant 1 heure à température ambiante. Après 3 lavages (PBS, tween20 0,05%), les puits ont été incubés avec l'anticorps primaire (anticorps de lapin dirigé contre la GST, dilution 1/2000, 100 μ L), puis avec l'anticorps secondaire (anticorps d'âne dirigé contre les IgG de lapin et couplé à la peroxydase, dilution 1/2500, 100 μ L). Ces incubations ont été réalisées pendant 2 heures à température ambiante et ont été suivies chaque fois de trois lavages. Finalement, les puits ont été lavés avec 200 μ L de tampon citrate (100 mM, pH 6) et la quantité d'anticorps secondaire, présente dans les différents puits, a été révélée à l'aide de TMB (tétraméthyl benzidine), un substrat coloré de la peroxydase. Après ajout de 25 μ L d'acide sulfurique (2 N), la densité optique à 450 nm a été mesurée dans chaque puits.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adair, B. D. & Yeager, M. (2002). Three-dimensional model of the human platelet integrin alpha IIb beta 3 based on electron cryomicroscopy and x-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14059-14064.
2. Albiges-Rizo, C., Frachet, P. & Block, M. R. (1995). Down regulation of talin alters cell adhesion and the processing of the alpha 5 beta 1 integrin. *J Cell Sci* 108 (Pt 10), 3317-3329.
3. Andre, P., Prasad, K. S., Denis, C. V., He, M., Papalia, J. M., Hynes, R. O., Phillips, D. R. & Wagner, D. D. (2002). CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat Med* 8, 247-252.
4. Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K. & Juliano, R. L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 50, 197-263.
5. Arias-Salgado, E. G., Lizano, S., Sarkar, S., Brugge, J. S., Ginsberg, M. H. & Shattil, S. J. (2003). Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13298-13302.
6. Arthur, H. M., Smith, K. M., Kodis, J. & McKelvie, R. (2002). A controlled trial of hospital versus home-based exercise in cardiac patients. *Med Sci Sports Exerc* 34, 1544-1550.
7. Bakolitsa, C., de Pereda, J. M., Bagshaw, C. R., Critchley, D. R. & Liddington, R. C. (1999). Crystal structure of the vinculin tail suggests a pathway for activation. *Cell* 99, 603-613.
8. Ballestrem, C., Hinz, B., Imhof, B. A. & Wehrle-Haller, B. (2001). Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J Cell Biol* 155, 1319-1332.
9. Barry, W. T., Boudignon-Proudhon, C., Shock, D. D., McFadden, A., Weiss, J. M., Sondek, J. & Parise, L. V. (2002). Molecular basis of CIB binding to the integrin alpha IIb cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 277, 28877-28883.
10. Barsukov, I. L., Prescott, A., Bate, N., Patel, B., Floyd, D. N., Bhanji, N., Bagshaw, C. R., Letinic, K., Di Paolo, G., De Camilli, P., *et al.* (2003). Phosphatidylinositol phosphate kinase type 1 gamma and beta1-integrin cytoplasmic domain bind to the same region in the talin FERM domain. *J Biol Chem* 278, 31202-31209.
11. Bass, M. D., Smith, B. J., Prigent, S. A. & Critchley, D. R. (1999). Talin contains three similar vinculin-binding sites predicted to form an amphipathic helix. *Biochem J* 341 (Pt 2), 257-263.
12. Bass, M. D., Patel, B., Barsukov, I. G., Fillingham, I. J., Mason, R., Smith, B. J., Bagshaw, C. R. & Critchley, D. R. (2002). Further characterization of the interaction between the cytoskeletal proteins talin and vinculin. *Biochem J* 362, 761-768.
13. Bastiaens, P. I. & Jovin, T. M. (1996). Microspectroscopic imaging tracks the intracellular processing of a signal transduction protein: fluorescent-labeled protein kinase C beta I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8407-8412.
14. Beckerle, M. C., Miller, D. E., Bertagnolli, M. E. & Locke, S. J. (1989). Activation-dependent redistribution of the adhesion plaque protein, talin, in intact human platelets. *J Cell Biol* 109, 3333-3346.
15. Beglova, N., Blacklow, S. C., Takagi, J. & Springer, T. A. (2002). Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nat Struct Biol* 9, 282-287.
16. Bellanger, J. M., Astier, C., Sardet, C., Ohta, Y., Stossel, T. P. & Debant, A. (2000). The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nat Cell Biol* 2, 888-892.
17. Bianchi, E., Denti, S., Granata, A., Bossi, G., Geginat, J., Villa, A., Rogge, L. & Pardi, R. (2000). Integrin LFA-1 interacts with the transcriptional co-activator JAB1 to modulate AP-1 activity. *Nature* 404, 617-621.
18. Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
19. Blanchard, A., Ohanian, V. & Critchley, D. (1989). The structure and function of alpha-actinin. *J Muscle Res Cell Motil* 10, 280-289.
20. Blockmans, D., Deckmyn, H. & Vermylen, J. (1995). Platelet activation. *Blood Rev* 9, 143-156.
21. Bogaert, T., Brown, N. & Wilcox, M. (1987). The Drosophila PS2 antigen is an invertebrate integrin that, like the fibronectin receptor, becomes localized to muscle attachments. *Cell* 51, 929-940.

22. Bolton, S. J., Barry, S. T., Mosley, H., Patel, B., Jockusch, B. M., Wilkinson, J. M. & Critchley, D. R. (1997). Monoclonal antibodies recognizing the N- and C-terminal regions of talin disrupt actin stress fibers when microinjected into human fibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton* **36**, 363-376.
23. Borisy, G. G. & Svitkina, T. M. (2000). Actin machinery: pushing the envelope. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 104-112.
24. Bork, P., Doerks, T., Springer, T. A. & Snel, B. (1999). Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem Sci* **24**, 261-263.
25. Borowsky, M. L. & Hynes, R. O. (1998). Layilin, a novel talin-binding transmembrane protein homologous with C-type lectins, is localized in membrane ruffles. *J Cell Biol* **143**, 429-442.
26. Bouvard, D., Vignoud, L., Dupe-Manet, S., Abed, N., Fournier, H. N., Vincent-Monegat, C., Retta, S. F., Fassler, R. & Block, M. R. (2003). Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 alpha. *J Biol Chem* **278**, 6567-6574.
27. Brakebusch, C., Bouvard, D., Stanchi, F., Sakai, T. & Fassler, R. (2002). Integrins in invasive growth. *J Clin Invest* **109**, 999-1006.
28. Brakebusch, C. & Fassler, R. (2003). The integrin-actin connection, an eternal love affair. *Embo J* **22**, 2324-2333.
29. Brancaccio, M., Guazzone, S., Menini, N., Sibona, E., Hirsch, E., De Andrea, M., Rocchi, M., Altruda, F., Tarone, G. & Silengo, L. (1999). Melusin is a new muscle-specific interactor for beta(1) integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **274**, 29282-29288.
30. Braun, A., Bordoy, R., Stanchi, F., Moser, M., Kostka, G. G., Ehler, E., Brandau, O. & Fassler, R. (2003). PINCH2 is a new five LIM domain protein, homologous to PINCH and localized to focal adhesions. *Exp Cell Res* **284**, 239-250.
31. Bray, P. F., Rosa, J. P., Lingappa, V. R., Kan, Y. W., McEver, R. P. & Shuman, M. A. (1986). Biogenesis of the platelet receptor for fibrinogen: evidence for separate precursors for glycoproteins IIb and IIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 1480-1484.
32. Bray, P. F., Rosa, J. P., Johnston, G. I., Shiu, D. T., Cook, R. G., Lau, C., Kan, Y. W., McEver, R. P. & Shuman, M. A. (1987). Platelet glycoprotein IIb. Chromosomal localization and tissue expression. *J Clin Invest* **80**, 1812-1817.
33. Bray, P. F., Barsh, G., Rosa, J. P., Luo, X. Y., Magenis, E. & Shuman, M. A. (1988). Physical linkage of the genes for platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8683-8687.
34. Bray, P. F. (1994). Inherited diseases of platelet glycoproteins: considerations for rapid molecular characterization. *Thromb Haemost* **72**, 492-502.
35. Briesewitz, R., Kern, A. & Marcantonio, E. E. (1995). Assembly and function of integrin receptors is dependent on opposing alpha and beta cytoplasmic domains. *Mol Biol Cell* **6**, 997-1010.
36. Brown, N. H., Gregory, S. L., Rickoll, W. L., Fessler, L. I., Prout, M., White, R. A. & Fristrom, J. W. (2002). Talin is essential for integrin function in *Drosophila*. *Dev Cell* **3**, 569-579.
37. Burridge, K. & Connell, L. (1983). A new protein of adhesion plaques and ruffling membranes. *J Cell Biol* **97**, 359-367.
38. Burridge, K. & Wennerberg, K. (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell* **116**, 167-179.
39. Calderwood, D. A., Zent, R., Grant, R., Rees, D. J., Hynes, R. O. & Ginsberg, M. H. (1999). The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem* **274**, 28071-28074.
40. Calderwood, D. A., Shattil, S. J. & Ginsberg, M. H. (2000). Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem* **275**, 22607-22610.
41. Calderwood, D. A., Yan, B., de Pereda, J. M., Alvarez, B. G., Fujioka, Y., Liddington, R. C. & Ginsberg, M. H. (2002). The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem* **277**, 21749-21758.
42. Calderwood, D. A., Fujioka, Y., de Pereda, J. M., Garcia-Alvarez, B., Nakamoto, T., Margolis, B., McGlade, C. J., Liddington, R. C. & Ginsberg, M. H. (2003). Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2272-2277.
43. Calderwood, D. A. & Ginsberg, M. H. (2003). Talin forges the links between integrins and actin. *Nat Cell Biol* **5**, 694-697.
44. Calderwood, D. A. (2004a). Integrin activation. *J Cell Sci* **117**, 657-666.
45. Calderwood, D. A. (2004b). Talin controls integrin activation. *Biochem Soc Trans* **32**, 434-437.
46. Calvete, J. J. & Gonzalez-Rodriguez, J. (1986). Isolation and biochemical characterization of the alpha- and beta-subunits of glycoprotein IIb of human platelet plasma membrane. *Biochem J* **240**, 155-161.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

47. Calvete, J. J., Henschen, A. & Gonzalez-Rodriguez, J. (1991). Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIIa. A disulphide pattern for the beta-subunits of the integrin family. *Biochem J* 274 (Pt 1), 63-71.
48. Calvete, J. J. (1995). On the structure and function of platelet integrin alpha IIb beta 3, the fibrinogen receptor. *Proc Soc Exp Biol Med* 208, 346-360.
49. Carlos, T. M. & Harlan, J. M. (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84, 2068-2101.
50. Carpen, O., Pallai, P., Staunton, D. E. & Springer, T. A. (1992). Association of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) with actin-containing cytoskeleton and alpha-actinin. *J Cell Biol* 118, 1223-1234.
51. Castresana, J. & Saraste, M. (1995). Does Vav bind to F-actin through a CH domain? *FEBS Lett* 374, 149-151.
52. Cattellino, A., Albertinazzi, C., Bossi, M., Critchley, D. R. & de Curtis, I. (1999). A cell-free system to study regulation of focal adhesions and of the connected actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 10, 373-391.
53. Chang, D. D., Wong, C., Smith, H. & Liu, J. (1997). ICAP-1, a novel beta1 integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of beta1 integrin. *J Cell Biol* 138, 1149-1157.
54. Chang, D. D., Hoang, B. Q., Liu, J. & Springer, T. A. (2002). Molecular basis for interaction between Icap1 alpha PTB domain and beta 1 integrin. *J Biol Chem* 277, 8140-8145.
55. Chen, H. C., Appeddu, P. A., Parsons, J. T., Hildebrand, J. D., Schaller, M. D. & Guan, J. L. (1995). Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem* 270, 16995-16999.
56. Chen, L. M., Bailey, D. & Fernandez-Valle, C. (2000). Association of beta 1 integrin with focal adhesion kinase and paxillin in differentiating Schwann cells. *J Neurosci* 20, 3776-3784.
57. Chen, P., Melchior, C., Brons, N. H., Schlegel, N., Caen, J. & Kieffer, N. (2001). Probing conformational changes in the I-like domain and the cysteine-rich repeat of human beta 3 integrins following disulfide bond disruption by cysteine mutations: identification of cysteine 598 involved in alphaIIb beta3 activation. *J Biol Chem* 276, 38628-38635.
58. Chen, W. J., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. (1990). NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 265, 3116-3123.
59. Cheresch, D. A., Berliner, S. A., Vicente, V. & Ruggeri, Z. M. (1989). Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells. *Cell* 58, 945-953.
60. Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
61. Christerson, L. B., Vanderbilt, C. A. & Cobb, M. H. (1999). MEKK1 interacts with alpha-actinin and localizes to stress fibers and focal adhesions. *Cell Motil Cytoskeleton* 43, 186-198.
62. Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2172-2175.
63. Clark, E. A., King, W. G., Brugge, J. S., Symons, M. & Hynes, R. O. (1998). Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J Cell Biol* 142, 573-586.
64. Cohen, P. & Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 769-776.
65. Colombatti, A., Bonaldo, P. & Doliana, R. (1993). Type A modules: interacting domains found in several non-fibrillar collagens and in other extracellular matrix proteins. *Matrix* 13, 297-306.
66. Cong, N. V., Uzan, G., Gross, M. S., Jegou-Foubert, C., Frachet, P., Boucheix, C., Marguerie, G. & Frezal, J. (1988). Assignment of human platelet GP2B (GPIIb) gene to chromosome 17, region q21.1-q21.3. *Hum Genet* 80, 389-392.
67. Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J. Y., Butcher, E. C. & Laudanna, C. (2000). Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* 13, 759-769.
68. Coppolino, M., Leung-Hagesteijn, C., Dedhar, S. & Wilkins, J. (1995). Inducible interaction of integrin alpha 2 beta 1 with calreticulin. Dependence on the activation state of the integrin. *J Biol Chem* 270, 23132-23138.
69. Coutts, A. S., MacKenzie, E., Griffith, E. & Black, D. M. (2003). TES is a novel focal adhesion protein with a role in cell spreading. *J Cell Sci* 116, 897-906.
70. Crawford, A. W., Michelsen, J. W. & Beckerle, M. C. (1992). An interaction between zyxin and alpha-actinin. *J Cell Biol* 116, 1381-1393.
71. Crespo, P., Schuebel, K. E., Ostrom, A. A., Gutkind, J. S. & Bustelo, X. R. (1997). Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature* 385, 169-172.
72. Critchley, D. R. (2000). Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr Opin Cell Biol* 12, 133-139.

73. D'Souza, S. E., Ginsberg, M. H., Burke, T. A., Lam, S. C. & Plow, E. F. (1988). Localization of an Arg-Gly-Asp recognition site within an integrin adhesion receptor. *Science* **242**, 91-93.
74. Das, B., Shu, X., Day, G. J., Han, J., Krishna, U. M., Falck, J. R. & Broek, D. (2000). Control of intramolecular interactions between the pleckstrin homology and Dbl homology domains of Vav and Sos1 regulates Rac binding. *J Biol Chem* **275**, 15074-15081.
75. Datta, A., Huber, F. & Boettiger, D. (2002). Phosphorylation of beta3 integrin controls ligand binding strength. *J Biol Chem* **277**, 3943-3949.
76. Davis, G. E. & Camarillo, C. W. (1993). Regulation of integrin-mediated myeloid cell adhesion to fibronectin: influence of disulfide reducing agents, divalent cations and phorbol ester. *J Immunol* **151**, 7138-7150.
77. Davison, M. D. & Critchley, D. R. (1988). alpha-Actinins and the DMD protein contain spectrin-like repeats. *Cell* **52**, 159-160.
78. De Melker, A. A., Kramer, D., Kuikman, I. & Sonnenberg, A. (1997). The two phenylalanines in the GFFKR motif of the integrin alpha6A subunit are essential for heterodimerization. *Biochem J* **328** (Pt 2), 529-537.
79. de Melker, A. A. & Sonnenberg, A. (1999). Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. *Bioessays* **21**, 499-509.
80. Degani, S., Balzac, F., Brancaccio, M., Guazzone, S., Retta, S. F., Silengo, L., Eva, A. & Tarone, G. (2002). The integrin cytoplasmic domain-associated protein ICAP-1 binds and regulates Rho family GTPases during cell spreading. *J Cell Biol* **156**, 377-387.
81. Delcomenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J. & Dedhar, S. (1998). Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11211-11216.
82. DeMali, K. A., Barlow, C. A. & Burridge, K. (2002). Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol* **159**, 881-891.
83. DePasquale, J. A. & Izzard, C. S. (1991). Accumulation of talin in nodes at the edge of the lamellipodium and separate incorporation into adhesion plaques at focal contacts in fibroblasts. *J Cell Biol* **113**, 1351-1359.
84. Di Paolo, G., Pellegrini, L., Letinic, K., Cestra, G., Zoncu, R., Voronov, S., Chang, S., Guo, J., Wenk, M. R. & De Camilli, P. (2002). Recruitment and regulation of phosphatidylinositol phosphate kinase type 1 gamma by the FERM domain of talin. *Nature* **420**, 85-89.
85. Diamond, M. S., Garcia-Aguilar, J., Bickford, J. K., Corbi, A. L. & Springer, T. A. (1993). The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J Cell Biol* **120**, 1031-1043.
86. Djinovic-Carugo, K., Young, P., Gautel, M. & Saraste, M. (1999). Structure of the alpha-actinin rod: molecular basis for cross-linking of actin filaments. *Cell* **98**, 537-546.
87. Doolittle, R. F., Watt, K. W., Cottrell, B. A., Strong, D. D. & Riley, M. (1979). The amino acid sequence of the alpha-chain of human fibrinogen. *Nature* **280**, 464-468.
88. Du, X., Gu, M., Weisel, J. W., Nagaswami, C., Bennett, J. S., Bowditch, R. & Ginsberg, M. H. (1993). Long range propagation of conformational changes in integrin alpha IIb beta 3. *J Biol Chem* **268**, 23087-23092.
89. Du, X., Saïdo, T. C., Tsubuki, S., Indig, F. E., Williams, M. J. & Ginsberg, M. H. (1995). Calpain cleavage of the cytoplasmic domain of the integrin beta 3 subunit. *J Biol Chem* **270**, 26146-26151.
90. Duperray, A., Berthier, R., Chagnon, E., Ryckewaert, J. J., Ginsberg, M., Plow, E. & Marguerie, G. (1987). Biosynthesis and processing of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes. *J Cell Biol* **104**, 1665-1673.
91. Duperray, A., Troesch, A., Berthier, R., Chagnon, E., Frachet, P., Uzan, G. & Marguerie, G. (1989). Biosynthesis and assembly of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes: evidence that assembly between pro-GPIIb and GPIIIa is a prerequisite for expression of the complex on the cell surface. *Blood* **74**, 1603-1611.
92. Dustin, M. L. & Springer, T. A. (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* **341**, 619-624.
93. Edwards, S. D. & Keep, N. H. (2001). The 2.7 Å crystal structure of the activated FERM domain of moesin: an analysis of structural changes on activation. *Biochemistry* **40**, 7061-7068.
94. Eigenthaler, M., Hofferer, L., Shattil, S. J. & Ginsberg, M. H. (1997). A conserved sequence motif in the integrin beta3 cytoplasmic domain is required for its specific interaction with beta3-endonexin. *J Biol Chem* **272**, 7693-7698.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

95. Eksioglu, Y. Z., Scheffer, I. E., Cardenas, P., Knoll, J., DiMario, F., Ramsby, G., Berg, M., Kamuro, K., Berkovic, S. F., Duyk, G. M., *et al.* (1996). Periventricular heterotopia: an X-linked dominant epilepsy locus causing aberrant cerebral cortical development. *Neuron* *16*, 77-87.
96. Emsley, J., King, S. L., Bergelson, J. M. & Liddington, R. C. (1997). Crystal structure of the I domain from integrin alpha2beta1. *J Biol Chem* *272*, 28512-28517.
97. Engqvist-Goldstein, A. E., Kessels, M. M., Chopra, V. S., Hayden, M. R. & Drubin, D. G. (1999). An actin-binding protein of the Sla2/Huntingtin interacting protein 1 family is a novel component of clathrin-coated pits and vesicles. *J Cell Biol* *147*, 1503-1518.
98. Erickson, M. G., Moon, D. L. & Yue, D. T. (2003). DsRed as a potential FRET partner with CFP and GFP. *Biophys J* *85*, 599-611.
99. Escolar, G., Diaz-Ricart, M. & White, J. G. (1995). Talin does not associate exclusively with alpha 2b beta 3 integrin in activated human platelets. *J Lab Clin Med* *125*, 597-607.
100. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* *420*, 629-635.
101. Farrell, D. H., Thiagarajan, P., Chung, D. W. & Davie, E. W. (1992). Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 10729-10732.
102. Farrell, D. H. & Thiagarajan, P. (1994). Binding of recombinant fibrinogen mutants to platelets. *J Biol Chem* *269*, 226-231.
103. Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L. L., Pepinsky, B. & Barsoum, J. (1994). Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 664-668.
104. Felding-Habermann, B. & Cheresh, D. A. (1993). Vitronectin and its receptors. *Curr Opin Cell Biol* *5*, 864-868.
105. Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. & Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 7413-7417.
106. Feng, S., Resendiz, J. C., Lu, X. & Kroll, M. H. (2003). Filamin A binding to the cytoplasmic tail of glycoprotein Ibalphalpha regulates von Willebrand factor-induced platelet activation. *Blood* *102*, 2122-2129.
107. Fincham, V. J. & Frame, M. C. (1998). The catalytic activity of Src is dispensable for translocation to focal adhesions but controls the turnover of these structures during cell motility. *Embo J* *17*, 81-92.
108. Fisher, P. R., Noegel, A. A., Fehheimer, M., Rivero, F., Prassler, J. & Gerisch, G. (1997). Photosensory and thermosensory responses in Dictyostelium slugs are specifically impaired by absence of the F-actin cross-linking gelation factor (ABP-120). *Curr Biol* *7*, 889-892.
109. Fitzgerald, L. A., Steiner, B., Rall, S. C., Jr., Lo, S. S. & Phillips, D. R. (1987). Protein sequence of endothelial glycoprotein IIIa derived from a cDNA clone. Identity with platelet glycoprotein IIIa and similarity to "integrin". *J Biol Chem* *262*, 3936-3939.
110. Fox, J. W., Lamperti, E. D., Eksioglu, Y. Z., Hong, S. E., Feng, Y., Graham, D. A., Scheffer, I. E., Dobyns, W. B., Hirsch, B. A., Radtke, R. A., *et al.* (1998). Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* *21*, 1315-1325.
111. Franco, S. J., Rodgers, M. A., Perrin, B. J., Han, J., Bennin, D. A., Critchley, D. R. & Huttenlocher, A. (2004). Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol* *6*, 977-983.
112. French, D. L. & Collier, B. S. (1997). Hematologically important mutations: Glanzmann thrombasthenia. *Blood Cells Mol Dis* *23*, 39-51.
113. Fukami, K., Endo, T., Imamura, M. & Takenawa, T. (1994). alpha-Actinin and vinculin are PIP2-binding proteins involved in signaling by tyrosine kinase. *J Biol Chem* *269*, 1518-1522.
114. Fullard, J. F. (2004). The role of the platelet glycoprotein IIb/IIIa in thrombosis and haemostasis. *Curr Pharm Des* *10*, 1567-1576.
115. Garcia-Alvarez, B., de Pereda, J. M., Calderwood, D. A., Ulmer, T. S., Critchley, D., Campbell, I. D., Ginsberg, M. H. & Liddington, R. C. (2003). Structural determinants of integrin recognition by talin. *Mol Cell* *11*, 49-58.
116. Gareis, M., Harrer, P. & Bertling, W. M. (1991). Homologous recombination of exogenous DNA fragments with genomic DNA in somatic cells of mice. *Cell Mol Biol* *37*, 191-203.
117. Geiger, B. & Bershadsky, A. (2001). Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol* *13*, 584-592.
118. Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R. & Yamada, K. M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 793-805.
119. Geiger, C., Nagel, W., Boehm, T., van Kooyk, Y., Figdor, C. G., Kremmer, E., Hogg, N., Zeitlmann, L., Dierks, H., Weber, K. S. & Kolanus, W. (2000). Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1. *Embo J* *19*, 2525-2536.

120. Gershon, H., Ghirlando, R., Guttman, S. B. & Minsky, A. (1993). Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry* 32, 7143-7151.
121. Gettner, S. N., Kenyon, C. & Reichardt, L. F. (1995). Characterization of beta pat-3 heterodimers, a family of essential integrin receptors in *C. elegans*. *J Cell Biol* 129, 1127-1141.
122. Giancotti, F. G. & Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science* 285, 1028-1032.
123. Gilmore, A. P., Wood, C., Ohanian, V., Jackson, P., Patel, B., Rees, D. J., Hynes, R. O. & Critchley, D. R. (1993). The cytoskeletal protein talin contains at least two distinct vinculin binding domains. *J Cell Biol* 122, 337-347.
124. Gilmore, A. P. & Burridge, K. (1996). Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate. *Nature* 381, 531-535.
125. Ginsberg, M. H., Loftus, J. C. & Plow, E. F. (1988). Cytoadhesins, integrins, and platelets. *Thromb Haemost* 59, 1-6.
126. Girault, J. A., Labesse, G., Mornon, J. P. & Callebaut, I. (1999). The N-termini of FAK and JAKs contain divergent band 4.1 domains. *Trends Biochem Sci* 24, 54-57.
127. Goldmann, W. H., Bremer, A., Haner, M., Aebi, U. & Isenberg, G. (1994a). Native talin is a dumbbell-shaped homodimer when it interacts with actin. *J Struct Biol* 112, 3-10.
128. Goldmann, W. H., Kas, J. & Isenberg, G. (1994b). Talin decreases the bending elasticity of actin filaments. *Biochem Soc Trans* 22, 46S.
129. Goldmann, W. H., Guttenberg, Z., Kaufmann, S., Hess, D., Ezzell, R. M. & Isenberg, G. (1997). Examining F-actin interaction with intact talin and talin head and tail fragment using static and dynamic light scattering. *Eur J Biochem* 250, 447-450.
130. Goldmann, W. H., Hess, D. & Isenberg, G. (1999). The effect of intact talin and talin tail fragment on actin filament dynamics and structure depends on pH and ionic strength. *Eur J Biochem* 260, 439-445.
131. Goldmann, W. H. (2000). Kinetic determination of focal adhesion protein formation. *Biochem Biophys Res Commun* 271, 553-557.
132. Grashoff, C., Aszodi, A., Sakai, T., Hunziker, E. B. & Fassler, R. (2003). Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO Rep* 4, 432-438.
133. Greenwood, J. A., Theibert, A. B., Prestwich, G. D. & Murphy-Ullrich, J. E. (2000). Restructuring of focal adhesion plaques by PI 3-kinase. Regulation by PtdIns (3,4,5)-p(3) binding to alpha-actinin. *J Cell Biol* 150, 627-642.
134. Gulino, D., Boudignon, C., Zhang, L. Y., Concord, E., Rabiet, M. J. & Marguerie, G. (1992). Ca(2+)-binding properties of the platelet glycoprotein IIb ligand-interacting domain. *J Biol Chem* 267, 1001-1007.
135. Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84, 345-357.
136. Haas, T. A. & Plow, E. F. (1994). Integrin-ligand interactions: a year in review. *Curr Opin Cell Biol* 6, 656-662.
137. Haas, T. A. & Plow, E. F. (1997). Development of a structural model for the cytoplasmic domain of an integrin. *Protein Eng* 10, 1395-1405.
138. Haimovich, B., Lipfert, L., Brugge, J. S. & Shattil, S. J. (1993). Tyrosine phosphorylation and cytoskeletal reorganization in platelets are triggered by interaction of integrin receptors with their immobilized ligands. *J Biol Chem* 268, 15868-15877.
139. Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.
140. Hamada, K., Shimizu, T., Matsui, T., Tsukita, S. & Hakoshima, T. (2000). Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *Embo J* 19, 4449-4462.
141. Han, B. G., Nunomura, W., Takakuwa, Y., Mohandas, N. & Jap, B. K. (2000). Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of cytoskeletal organization. *Nat Struct Biol* 7, 871-875.
142. Han, D. C. & Guan, J. L. (1999). Association of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration. *J Biol Chem* 274, 24425-24430.
143. Han, J., Das, B., Wei, W., Van Aelst, L., Mosteller, R. D., Khosravi-Far, R., Westwick, J. K., Der, C. J. & Broek, D. (1997). Lck regulates Vav activation of members of the Rho family of GTPases. *Mol Cell Biol* 17, 1346-1353.
144. Hanks, S. K., Calalb, M. B., Harper, M. C. & Patel, S. K. (1992). Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8487-8491.
145. Hannigan, G. E., Leung-Hagsteyn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M. G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J. C. & Dedhar, S. (1996). Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 379, 91-96.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

146. Hato, T., Pampori, N. & Shattil, S. J. (1998). Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling functions of integrin alphaIIb beta3. *J Cell Biol* *141*, 1685-1695.
147. Hawiger, J., Kloczewiak, M., Bednarek, M. A. & Timmons, S. (1989). Platelet receptor recognition domains on the alpha chain of human fibrinogen: structure-function analysis. *Biochemistry* *28*, 2909-2914.
148. Heidenreich, R., Eisman, R., Surrey, S., Delgrosso, K., Bennett, J. S., Schwartz, E. & Poncz, M. (1990). Organization of the gene for platelet glycoprotein IIb. *Biochemistry* *29*, 1232-1244.
149. Heiska, L., Kantor, C., Parr, T., Critchley, D. R., Vilja, P., Gahmberg, C. G. & Carpen, O. (1996). Binding of the cytoplasmic domain of intercellular adhesion molecule-2 (ICAM-2) to alpha-actinin. *J Biol Chem* *271*, 26214-26219.
150. Hemler, M. E., Huang, C. & Schwarz, L. (1987). The VLA protein family. Characterization of five distinct cell surface heterodimers each with a common 130,000 molecular weight beta subunit. *J Biol Chem* *262*, 3300-3309.
151. Hemler, M. E. (1998). Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* *10*, 578-585.
152. Hemmings, L., Rees, D. J., Ohanian, V., Bolton, S. J., Gilmore, A. P., Patel, B., Priddle, H., Trevithick, J. E., Hynes, R. O. & Critchley, D. R. (1996). Talin contains three actin-binding sites each of which is adjacent to a vinculin-binding site. *J Cell Sci* *109* (Pt 11), 2715-2726.
153. Hermand, P., Gane, P., Huet, M., Jallu, V., Kaplan, C., Sonneborn, H. H., Cartron, J. P. & Bailly, P. (2003). Red cell ICAM-4 is a novel ligand for platelet-activated alpha IIbeta 3 integrin. *J Biol Chem* *278*, 4892-4898.
154. Hildebrand, J. D., Schaller, M. D. & Parsons, J. T. (1993). Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. *J Cell Biol* *123*, 993-1005.
155. Hildebrand, J. D., Schaller, M. D. & Parsons, J. T. (1995). Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol Biol Cell* *6*, 637-647.
156. Hill, M. M., Feng, J. & Hemmings, B. A. (2002). Identification of a plasma membrane Raft-associated PKB Ser473 kinase activity that is distinct from ILK and PDK1. *Curr Biol* *12*, 1251-1255.
157. Hmama, Z., Knutson, K. L., Herrera-Velitz, P., Nandan, D. & Reiner, N. E. (1999). Monocyte adherence induced by lipopolysaccharide involves CD14, LFA-1, and cytohesin-1. Regulation by Rho and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* *274*, 1050-1057.
158. Holmback, K., Danton, M. J., Suh, T. T., Daugherty, C. C. & Degen, J. L. (1996). Impaired platelet aggregation and sustained bleeding in mice lacking the fibrinogen motif bound by integrin alpha IIb beta 3. *Embo J* *15*, 5760-5771.
159. Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W. & Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* *347*, 44-49.
160. Holtzman, D. A., Yang, S. & Drubin, D. G. (1993). Synthetic-lethal interactions identify two novel genes, SLA1 and SLA2, that control membrane cytoskeleton assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* *122*, 635-644.
161. Honda, S., Tomiyama, Y., Shiraga, M., Tadokoro, S., Takamatsu, J., Saito, H., Kurata, Y. & Matsuzawa, Y. (1998). A two-amino acid insertion in the Cys146- Cys167 loop of the alphaIIb subunit is associated with a variant of Glanzmann thrombasthenia. Critical role of Asp163 in ligand binding. *J Clin Invest* *102*, 1183-1192.
162. Horwitz, A., Duggan, K., Buck, C., Beckerle, M. C. & Burridge, K. (1986). Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage. *Nature* *320*, 531-533.
163. Huang, C. & Springer, T. A. (1997). Folding of the beta-propeller domain of the integrin alphaL subunit is independent of the I domain and dependent on the beta2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 3162-3167.
164. Hughes, P. E., Diaz-Gonzalez, F., Leong, L., Wu, C., McDonald, J. A., Shattil, S. J. & Ginsberg, M. H. (1996). Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem* *271*, 6571-6574.
165. Humphries, M. J. (1990). The molecular basis and specificity of integrin-ligand interactions. *J Cell Sci* *97* (Pt 4), 585-592.
166. Humphries, M. J. (2000). Integrin cell adhesion receptors and the concept of agonism. *Trends Pharmacol Sci* *21*, 29-32.
167. Hynes, R. O. (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* *48*, 549-554.
168. Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* *69*, 11-25.
169. Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673-687.

170. Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M. & Yamamoto, T. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* *377*, 539-544.
171. Iwamoto, S., Nishiumi, E., Kajii, E. & Ikemoto, S. (1994). An exon 28 mutation resulting in alternative splicing of the glycoprotein IIb transcript and Glanzmann's thrombasthenia. *Blood* *83*, 1017-1023.
172. Izaguirre, G., Aguirre, L., Hu, Y. P., Lee, H. Y., Schlaepfer, D. D., Aneskievich, B. J. & Haimovich, B. (2001). The cytoskeletal/non-muscle isoform of alpha-actinin is phosphorylated on its actin-binding domain by the focal adhesion kinase. *J Biol Chem* *276*, 28676-28685.
173. Izard, T. & Vornrhein, C. (2004). Structural basis for amplifying vinculin activation by talin. *J Biol Chem* *279*, 27667-27678.
174. Izard, T., Evans, G., Borgon, R. A., Rush, C. L., Bricogne, G. & Bois, P. R. (2004). Vinculin activation by talin through helical bundle conversion. *Nature* *427*, 171-175.
175. Jenkins, A. L., Nannizzi-Alaimo, L., Silver, D., Sellers, J. R., Ginsberg, M. H., Law, D. A. & Phillips, D. R. (1998). Tyrosine phosphorylation of the beta3 cytoplasmic domain mediates integrin-cytoskeletal interactions. *J Biol Chem* *273*, 13878-13885.
176. Jennings, L. K. & Phillips, D. R. (1982). Purification of glycoproteins IIb and III from human platelet plasma membranes and characterization of a calcium-dependent glycoprotein IIb-III complex. *J Biol Chem* *257*, 10458-10466.
177. Jiang, G., Giannone, G., Critchley, D. R., Fukumoto, E. & Sheetz, M. P. (2003). Two-piconewton slip bond between fibronectin and the cytoskeleton depends on talin. *Nature* *424*, 334-337.
178. Johansson, M. W., Larsson, E., Luning, B., Pasquale, E. B. & Ruoslahti, E. (1994). Altered localization and cytoplasmic domain-binding properties of tyrosine-phosphorylated beta 1 integrin. *J Cell Biol* *126*, 1299-1309.
179. Johnson, R. P. & Craig, S. W. (1994). An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding. *J Biol Chem* *269*, 12611-12619.
180. Johnson, R. P. & Craig, S. W. (1995). F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and tail domains. *Nature* *373*, 261-264.
181. Kamata, T., Tieu, K. K., Irie, A., Springer, T. A. & Takada, Y. (2001). Amino acid residues in the alpha IIb subunit that are critical for ligand binding to integrin alpha IIbbeta 3 are clustered in the beta-propeller model. *J Biol Chem* *276*, 44275-44283.
182. Kashiwagi, H., Schwartz, M. A., Eigenthaler, M., Davis, K. A., Ginsberg, M. H. & Shattil, S. J. (1997). Affinity modulation of platelet integrin alphaIIbbeta3 by beta3-endonexin, a selective binding partner of the beta3 integrin cytoplasmic tail. *J Cell Biol* *137*, 1433-1443.
183. Kato, A., Kawamata, N., Tamayose, K., Egashira, M., Miura, R., Fujimura, T., Murayama, K. & Oshimi, K. (2002). Ancient ubiquitous protein 1 binds to the conserved membrane-proximal sequence of the cytoplasmic tail of the integrin alpha subunits that plays a crucial role in the inside-out signaling of alpha IIbbeta 3. *J Biol Chem* *277*, 28934-28941.
184. Kaufmann, S., Piekenbrock, T., Goldmann, W. H., Barmann, M. & Isenberg, G. (1991). Talin binds to actin and promotes filament nucleation. *FEBS Lett* *284*, 187-191.
185. Keely, P. J., Westwick, J. K., Whitehead, I. P., Der, C. J. & Parise, L. V. (1997). Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* *390*, 632-636.
186. Kieffer, J. D., Plopper, G., Ingber, D. E., Hartwig, J. H. & Kupper, T. S. (1995). Direct binding of F actin to the cytoplasmic domain of the alpha 2 integrin chain in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* *217*, 466-474.
187. Kieffer, N. & Phillips, D. R. (1990). Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. *Annu Rev Cell Biol* *6*, 329-357.
188. Kieffer, N., Fitzgerald, L. A., Wolf, D., Cheresch, D. A. & Phillips, D. R. (1991). Adhesive properties of the beta 3 integrins: comparison of GP IIb-IIIa and the vitronectin receptor individually expressed in human melanoma cells. *J Cell Biol* *113*, 451-461.
189. Kim, M., Carman, C. V. & Springer, T. A. (2003). Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* *301*, 1720-1725.
190. Kishimoto, T. K., O'Connor, K., Lee, A., Roberts, T. M. & Springer, T. A. (1987). Cloning of the beta subunit of the leukocyte adhesion proteins: homology to an extracellular matrix receptor defines a novel supergene family. *Cell* *48*, 681-690.
191. Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Sugimura, H., Kurata, T. & Matsuda, M. (1998). Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev* *12*, 3331-3336.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

192. Kloczewiak, M., Timmons, S. & Hawiger, J. (1982). Localization of a site interacting with human platelet receptor on carboxy-terminal segment of human fibrinogen gamma chain. *Biochem Biophys Res Commun* 107, 181-187.
193. Kloczewiak, M., Timmons, S. & Hawiger, J. (1983). Recognition site for the platelet receptor is present on the 15-residue carboxy-terminal fragment of the gamma chain of human fibrinogen and is not involved in the fibrin polymerization reaction. *Thromb Res* 29, 249-255.
194. Kloczewiak, M., Timmons, S., Lukas, T. J. & Hawiger, J. (1984). Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the gamma chain. *Biochemistry* 23, 1767-1774.
195. Knezevic, I., Leisner, T. M. & Lam, S. C. (1996). Direct binding of the platelet integrin alphaIIb beta3 (GPIIb-IIIa) to talin. Evidence that interaction is mediated through the cytoplasmic domains of both alphaIIb and beta3. *J Biol Chem* 271, 16416-16421.
196. Kolanus, W., Nagel, W., Schiller, B., Zeitmann, L., Godar, S., Stockinger, H. & Seed, B. (1996). Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell* 86, 233-242.
197. Kornberg, L. J., Earp, H. S., Turner, C. E., Prockop, C. & Juliano, R. L. (1991). Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of beta 1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8392-8396.
198. Kost, B., Spielhofer, P. & Chua, N. H. (1998). A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *Plant J* 16, 393-401.
199. Koster, J., Kuikman, I., Kreft, M. & Sonnenberg, A. (2001). Two different mutations in the cytoplasmic domain of the integrin beta 4 subunit in nonlethal forms of epidermolysis bullosa prevent interaction of beta 4 with plectin. *J Invest Dermatol* 117, 1405-1411.
200. Kouns, W. C., Steiner, B., Kunicki, T. J., Moog, S., Jutzi, J., Jennings, L. K., Cazenave, J. P. & Lanza, F. (1994). Activation of the fibrinogen binding site on platelets isolated from a patient with the Strasbourg I variant of Glanzmann's thrombasthenia. *Blood* 84, 1108-1115.
201. Lam, S. C., Plow, E. F., Smith, M. A., Andrieux, A., Ryckwaert, J. J., Marguerie, G. & Ginsberg, M. H. (1987). Evidence that arginyl-glycyl-aspartate peptides and fibrinogen gamma chain peptides share a common binding site on platelets. *J Biol Chem* 262, 947-950.
202. Lane, D. A., Cuddigan, B., VanRoss, M. & Kakkar, V. V. (1980). Dysfibrinogenaemia characterized by abnormal fibrin monomer polymerization and normal fibrinopeptide A release. *Br J Haematol* 44, 483-494.
203. Lanza, F., Kieffer, N., Phillips, D. R. & Fitzgerald, L. A. (1990). Characterization of the human platelet glycoprotein IIIa gene. Comparison with the fibronectin receptor beta-subunit gene. *J Biol Chem* 265, 18098-18103.
204. Laukaitis, C. M., Webb, D. J., Donais, K. & Horwitz, A. F. (2001). Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *J Cell Biol* 153, 1427-1440.
205. Law, D. A., Nannizzi-Alaimo, L. & Phillips, D. R. (1996). Outside-in integrin signal transduction. Alpha IIb beta 3-(GP IIb IIIa) tyrosine phosphorylation induced by platelet aggregation. *J Biol Chem* 271, 10811-10815.
206. Lee, H. S., Bellin, R. M., Walker, D. L., Patel, B., Powers, P., Liu, H., Garcia-Alvarez, B., de Pereda, J. M., Liddington, R. C., Volkman, N., *et al.* (2004). Characterization of an actin-binding site within the talin FERM domain. *J Mol Biol* 343, 771-784.
207. Lee, J. O., Rieu, P., Arnaout, M. A. & Liddington, R. (1995). Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* 80, 631-638.
208. Legge, G. B., Kriwacki, R. W., Chung, J., Hommel, U., Ramage, P., Case, D. A., Dyson, H. J. & Wright, P. E. (2000). NMR solution structure of the inserted domain of human leukocyte function associated antigen-1. *J Mol Biol* 295, 1251-1264.
209. Leinweber, B. D., Leavis, P. C., Grabarek, Z., Wang, C. L. & Morgan, K. G. (1999). Extracellular regulated kinase (ERK) interaction with actin and the calponin homology (CH) domain of actin-binding proteins. *Biochem J* 344 Pt 1, 117-123.
210. Leisner, T. M., Wencel-Drake, J. D., Wang, W. & Lam, S. C. (1999). Bidirectional transmembrane modulation of integrin alphaIIb beta3 conformations. *J Biol Chem* 274, 12945-12949.
211. Leng, L., Kashiwagi, H., Ren, X. D. & Shattil, S. J. (1998). RhoA and the function of platelet integrin alphaIIb beta3. *Blood* 91, 4206-4215.
212. Leung-Hagesteijn, C. Y., Milankov, K., Michalak, M., Wilkins, J. & Dedhar, S. (1994). Cell attachment to extracellular matrix substrates is inhibited upon downregulation of expression of calreticulin, an intracellular integrin alpha-subunit-binding protein. *J Cell Sci* 107 (Pt 3), 589-600.

213. Li, B. & Trueb, B. (2001). Analysis of the alpha-actinin/zyxin interaction. *J Biol Chem* 276, 33328-33335.
214. Li, J., Mayne, R. & Wu, C. (1999a). A novel muscle-specific beta 1 integrin binding protein (MIBP) that modulates myogenic differentiation. *J Cell Biol* 147, 1391-1398.
215. Li, M. G., Serr, M., Edwards, K., Ludmann, S., Yamamoto, D., Tilney, L. G., Field, C. M. & Hays, T. S. (1999b). Filamin is required for ring canal assembly and actin organization during *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol* 146, 1061-1074.
216. Li, R., Rieu, P., Griffith, D. L., Scott, D. & Arnaout, M. A. (1998). Two functional states of the CD11b A-domain: correlations with key features of two Mn²⁺-complexed crystal structures. *J Cell Biol* 143, 1523-1534.
217. Li, R., Babu, C. R., Lear, J. D., Wand, A. J., Bennett, J. S. & DeGrado, W. F. (2001). Oligomerization of the integrin alphaIIb beta3: roles of the transmembrane and cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12462-12467.
218. Liddington, R. & Bankston, L. (1998). The integrin I domain: crystals, metals and related artefacts. *Structure* 6, 937-938.
219. Liddington, R. C. & Ginsberg, M. H. (2002). Integrin activation takes shape. *J Cell Biol* 158, 833-839.
220. Liliental, J. & Chang, D. D. (1998). Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin beta subunit. *J Biol Chem* 273, 2379-2383.
221. Lim, W. A. (2002). The modular logic of signaling proteins: building allosteric switches from simple binding domains. *Curr Opin Struct Biol* 12, 61-68.
222. Lin, Y., Kishi, H., Nakamura, A., Takagi, T. & Kohama, K. (1998). N-terminal myosin-binding fragment of talin. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 656-659.
223. Ling, K., Doughman, R. L., Firestone, A. J., Bunce, M. W. & Anderson, R. A. (2002). Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. *Nature* 420, 89-93.
224. Ling, K., Doughman, R. L., Iyer, V. V., Firestone, A. J., Bairstow, S. F., Mosher, D. F., Schaller, M. D. & Anderson, R. A. (2003). Tyrosine phosphorylation of type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase by Src regulates an integrin-talin switch. *J Cell Biol* 163, 1339-1349.
225. Lipfert, L., Haimovich, B., Schaller, M. D., Cobb, B. S., Parsons, J. T. & Brugge, J. S. (1992). Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets. *J Cell Biol* 119, 905-912.
226. Liu, S., Thomas, S. M., Woodside, D. G., Rose, D. M., Kiosses, W. B., Pfaff, M. & Ginsberg, M. H. (1999). Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses. *Nature* 402, 676-681.
227. Liu, S., Calderwood, D. A. & Ginsberg, M. H. (2000). Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* 113 (Pt 20), 3563-3571.
228. Liu, S., Slepak, M. & Ginsberg, M. H. (2001). Binding of Paxillin to the alpha 9 Integrin Cytoplasmic Domain Inhibits Cell Spreading. *J Biol Chem* 276, 37086-37092.
229. Loftus, J. C., O'Toole, T. E., Plow, E. F., Glass, A., Frelinger, A. L., 3rd & Ginsberg, M. H. (1990). A beta 3 integrin mutation abolishes ligand binding and alters divalent cation-dependent conformation. *Science* 249, 915-918.
230. Lollo, B. A., Chan, K. W., Hanson, E. M., Moy, V. T. & Brian, A. A. (1993). Direct evidence for two affinity states for lymphocyte function-associated antigen 1 on activated T cells. *J Biol Chem* 268, 21693-21700.
231. Loo, D. T., Kanner, S. B. & Aruffo, A. (1998). Filamin binds to the cytoplasmic domain of the beta1-integrin. Identification of amino acids responsible for this interaction. *J Biol Chem* 273, 23304-23312.
232. Lu, C., Oxvig, C. & Springer, T. A. (1998). The structure of the beta-propeller domain and C-terminal region of the integrin alphaM subunit. Dependence on beta subunit association and prediction of domains. *J Biol Chem* 273, 15138-15147.
233. Lu, C., Takagi, J. & Springer, T. A. (2001). Association of the membrane proximal regions of the alpha and beta subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the inactive state. *J Biol Chem* 276, 14642-14648.
234. Mackinnon, A. C., Qadota, H., Norman, K. R., Moerman, D. G. & Williams, B. D. (2002). *C. elegans* PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr Biol* 12, 787-797.
235. Mangeat, P., Roy, C. & Martin, M. (1999). ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol* 9, 187-192.
236. Martel, V., Racaud-Sultan, C., Dupe, S., Marie, C., Paulhe, F., Galmiche, A., Block, M. R. & Albiges-Rizo, C. (2001). Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J Biol Chem* 276, 21217-21227.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

237. Marti, A., Luo, Z., Cunningham, C., Ohta, Y., Hartwig, J., Stossel, T. P., Kyriakis, J. M. & Avruch, J. (1997). Actin-binding protein-280 binds the stress-activated protein kinase (SAPK) activator SEK-1 and is required for tumor necrosis factor-alpha activation of SAPK in melanoma cells. *J Biol Chem* 272, 2620-2628.
238. McCann, R. O. & Craig, S. W. (1997). The I/LWEQ module: a conserved sequence that signifies F-actin binding in functionally diverse proteins from yeast to mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5679-5684.
239. McCann, R. O. & Craig, S. W. (1999). Functional genomic analysis reveals the utility of the I/LWEQ module as a predictor of protein:actin interaction. *Biochem Biophys Res Commun* 266, 135-140.
240. McGregor, A., Blanchard, A. D., Rowe, A. J. & Critchley, D. R. (1994). Identification of the vinculin-binding site in the cytoskeletal protein alpha-actinin. *Biochem J* 301 (Pt 1), 225-233.
241. McLachlan, A. D., Stewart, M., Hynes, R. O. & Rees, D. J. (1994). Analysis of repeated motifs in the talin rod. *J Mol Biol* 235, 1278-1290.
242. Michishita, M., Videm, V. & Arnaout, M. A. (1993). A novel divalent cation-binding site in the A domain of the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding. *Cell* 72, 857-867.
243. Miller, G. J., Dunn, S. D. & Ball, E. H. (2001). Interaction of the N- and C-terminal domains of vinculin. Characterization and mapping studies. *J Biol Chem* 276, 11729-11734.
244. Miranti, C. K., Leng, L., Maschberger, P., Brugge, J. S. & Shattil, S. J. (1998). Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. *Curr Biol* 8, 1289-1299.
245. Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M. & Tsien, R. Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388, 882-887.
246. Molony, L., McCaslin, D., Abernethy, J., Paschal, B. & Burrige, K. (1987). Properties of talin from chicken gizzard smooth muscle. *J Biol Chem* 262, 7790-7795.
247. Monkley, S. J., Zhou, X. H., Kinston, S. J., Giblett, S. M., Hemmings, L., Priddle, H., Brown, J. E., Pritchard, C. A., Critchley, D. R. & Fassler, R. (2000). Disruption of the talin gene arrests mouse development at the gastrulation stage. *Dev Dyn* 219, 560-574.
248. Monkley, S. J., Pritchard, C. A. & Critchley, D. R. (2001). Analysis of the mammalian talin2 gene TLN2. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 880-885.
249. Muguruma, M., Nishimuta, S., Tomisaka, Y., Ito, T. & Matsumura, S. (1995). Organization of the functional domains in membrane cytoskeletal protein talin. *J Biochem (Tokyo)* 117, 1036-1042.
250. Mukai, H., Toshimori, M., Shibata, H., Takanaga, H., Kitagawa, M., Miyahara, M., Shimakawa, M. & Ono, Y. (1997). Interaction of PKN with alpha-actinin. *J Biol Chem* 272, 4740-4746.
251. Nagahara, H., Vocero-Akbani, A. M., Snyder, E. L., Ho, A., Latham, D. G., Lissy, N. A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S. A. & Dowdy, S. F. (1998). Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med* 4, 1449-1452.
252. Nagel, W., Zeitlmann, L., Schilcher, P., Geiger, C., Kolanus, J. & Kolanus, W. (1998). Phosphoinositide 3-OH kinase activates the beta2 integrin adhesion pathway and induces membrane recruitment of cytohesin-1. *J Biol Chem* 273, 14853-14861.
253. Naik, U. P., Patel, P. M. & Parise, L. V. (1997). Identification of a novel calcium-binding protein that interacts with the integrin alphaIIb cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 272, 4651-4654.
254. Naik, U. P. & Naik, M. U. (2003). Association of CIB with GPIIb/IIIa during outside-in signaling is required for platelet spreading on fibrinogen. *Blood* 102, 1355-1362.
255. Neerman-Arbez, M., de Moerloose, P., Bridel, C., Honsberger, A., Schonborner, A., Rossier, C., Peerlinck, K., Claeysens, S., Di Michele, D., d'Oiron, R., *et al.* (2000). Mutations in the fibrinogen alpha gene account for the majority of cases of congenital afibrinogenemia. *Blood* 96, 149-152.
256. Niggli, V., Kaufmann, S., Goldmann, W. H., Weber, T. & Isenberg, G. (1994). Identification of functional domains in the cytoskeletal protein talin. *Eur J Biochem* 224, 951-957.
257. Nikolopoulos, S. N. & Turner, C. E. (2000). Actopaxin, a new focal adhesion protein that binds paxillin LD motifs and actin and regulates cell adhesion. *J Cell Biol* 151, 1435-1448.
258. Nikolopoulos, S. N. & Turner, C. E. (2001). Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions. *J Biol Chem* 276, 23499-23505.
259. Nobes, C. D. & Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
260. Nolte, M., Pepinsky, R. B., Venyaminov, S., Kotliansky, V., Gotwals, P. J. & Karpusas, M. (1999). Crystal structure of the alpha1beta1 integrin I-domain: insights into integrin I-domain function. *FEBS Lett* 452, 379-385.

261. Novak, A., Hsu, S. C., Leung-Hagesteijn, C., Radeva, G., Papkoff, J., Montesano, R., Roskelley, C., Grosschedl, R. & Dedhar, S. (1998). Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 4374-4379.
262. Nuckolls, G. H., Romer, L. H. & Burridge, K. (1992). Microinjection of antibodies against talin inhibits the spreading and migration of fibroblasts. *J Cell Sci* *102* (Pt 4), 753-762.
263. Nurden, A. T. & Caen, J. P. (1974). An abnormal platelet glycoprotein pattern in three cases of Glanzmann's thrombasthenia. *Br J Haematol* *28*, 253-260.
264. O'Halloran, T., Beckerle, M. C. & Burridge, K. (1985). Identification of talin as a major cytoplasmic protein implicated in platelet activation. *Nature* *317*, 449-451.
265. O'Neill, S., Robinson, A., Deering, A., Ryan, M., Fitzgerald, D. J. & Moran, N. (2000). The platelet integrin alpha IIb beta 3 has an endogenous thiol isomerase activity. *J Biol Chem* *275*, 36984-36990.
266. O'Toole, T. E., Loftus, J. C., Plow, E. F., Glass, A. A., Harper, J. R. & Ginsberg, M. H. (1989). Efficient surface expression of platelet GPIIb-IIIa requires both subunits. *Blood* *74*, 14-18.
267. O'Toole, T. E., Loftus, J. C., Du, X. P., Glass, A. A., Ruggeri, Z. M., Shattil, S. J., Plow, E. F. & Ginsberg, M. H. (1990). Affinity modulation of the alpha IIb beta 3 integrin (platelet GPIIb-IIIa) is an intrinsic property of the receptor. *Cell Regul* *1*, 883-893.
268. Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J. H. & Stossel, T. P. (1999). The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 2122-2128.
269. Olski, T. M., Noegel, A. A. & Korenbaum, E. (2001). Parvin, a 42 kDa focal adhesion protein, related to the alpha-actinin superfamily. *J Cell Sci* *114*, 525-538.
270. Otey, C. A., Pavalko, F. M. & Burridge, K. (1990). An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *J Cell Biol* *111*, 721-729.
271. Otey, C. A. & Carpen, O. (2004). Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton* *58*, 104-111.
272. Pantaloni, D., Le Clainche, C. & Carlier, M. F. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science* *292*, 1502-1506.
273. Papagrigoriou, E., Gingras, A. R., Barsukov, I. L., Bate, N., Fillingham, I. J., Patel, B., Frank, R., Ziegler, W. H., Roberts, G. C., Critchley, D. R. & Emsley, J. (2004). Activation of a vinculin-binding site in the talin rod involves rearrangement of a five-helix bundle. *Embo J* *23*, 2942-2951.
274. Parise, L. V., Helgerson, S. L., Steiner, B., Nannizzi, L. & Phillips, D. R. (1987). Synthetic peptides derived from fibrinogen and fibronectin change the conformation of purified platelet glycoprotein IIb-IIIa. *J Biol Chem* *262*, 12597-12602.
275. Pascual, J., Castresana, J. & Saraste, M. (1997). Evolution of the spectrin repeat. *Bioessays* *19*, 811-817.
276. Patil, S., Jedsadayamata, A., Wencel-Drake, J. D., Wang, W., Knezevic, I. & Lam, S. C. (1999). Identification of a talin-binding site in the integrin beta(3) subunit distinct from the NPLY regulatory motif of post-ligand binding functions. The talin n-terminal head domain interacts with the membrane-proximal region of the beta(3) cytoplasmic tail. *J Biol Chem* *274*, 28575-28583.
277. Patterson, G. H., Piston, D. W. & Barisas, B. G. (2000). Forster distances between green fluorescent protein pairs. *Anal Biochem* *284*, 438-440.
278. Pavalko, F. M., Otey, C. A. & Burridge, K. (1989). Identification of a filamin isoform enriched at the ends of stress fibers in chicken embryo fibroblasts. *J Cell Sci* *94* (Pt 1), 109-118.
279. Pavalko, F. M. & Burridge, K. (1991). Disruption of the actin cytoskeleton after microinjection of proteolytic fragments of alpha-actinin. *J Cell Biol* *114*, 481-491.
280. Pearson, M. A., Reczek, D., Bretscher, A. & Karplus, P. A. (2000). Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* *101*, 259-270.
281. Peerschke, E. I. (1995). Regulation of platelet aggregation by post-fibrinogen binding events. Insights provided by dithiothreitol-treated platelets. *Thromb Haemost* *73*, 862-867.
282. Pfaff, M., Liu, S., Erle, D. J. & Ginsberg, M. H. (1998). Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *J Biol Chem* *273*, 6104-6109.
283. Pfaff, M., Du, X. & Ginsberg, M. H. (1999). Calpain cleavage of integrin beta cytoplasmic domains. *FEBS Lett* *460*, 17-22.
284. Phillips, D. R. & Agin, P. P. (1977). Platelet membrane defects in Glanzmann's thrombasthenia. Evidence for decreased amounts of two major glycoproteins. *J Clin Invest* *60*, 535-545.
285. Phillips, D. R., Charo, I. F., Parise, L. V. & Fitzgerald, L. A. (1988). The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* *71*, 831-843.
286. Plançon, S., Morel-Kopp, M. C., Schaffner-Reckinger, E., Chen, P. & Kieffer, N. (2001). Green fluorescent protein (GFP) tagged to the cytoplasmic tail of alphaIIb or beta3 allows the expression of a fully functional integrin alphaIIb(beta3): effect of beta3GFP on alphaIIb(beta3) ligand binding. *Biochem J* *357*, 529-536.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

287. Plow, E. F., McEver, R. P., Collier, B. S., Woods, V. L., Jr., Marguerie, G. A. & Ginsberg, M. H. (1985). Related binding mechanisms for fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor, and thrombospondin on thrombin-stimulated human platelets. *Blood* 66, 724-727.
288. Plow, E. F., Loftus, J. C., Levin, E. G., Fair, D. S., Dixon, D., Forsyth, J. & Ginsberg, M. H. (1986). Immunologic relationship between platelet membrane glycoprotein GPIIb/IIIa and cell surface molecules expressed by a variety of cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6002-6006.
289. Plow, E. F. & Ginsberg, M. H. (1989). Cellular adhesion: GPIIb-IIIa as a prototypic adhesion receptor. *Prog Hemost Thromb* 9, 117-156.
290. Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J. & Smith, J. W. (2000). Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 275, 21785-21788.
291. Pollard, T. D. & Mooseker, M. S. (1981). Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores. *J Cell Biol* 88, 654-659.
292. Poncz, M. & Newman, P. J. (1990). Analysis of rodent platelet glycoprotein IIb: evidence for evolutionarily conserved domains and alternative proteolytic processing. *Blood* 75, 1282-1289.
293. Ponting, C. P., Schultz, J., Copley, R. R., Andrade, M. A. & Bork, P. (2000). Evolution of domain families. *Adv Protein Chem* 54, 185-244.
294. Prandini, M. H., Denarier, E., Frachet, P., Uzan, G. & Marguerie, G. (1988). Isolation of the human platelet glycoprotein IIb gene and characterization of the 5' flanking region. *Biochem Biophys Res Commun* 156, 595-601.
295. Priddle, H., Hemmings, L., Monkley, S., Woods, A., Patel, B., Sutton, D., Dunn, G. A., Zicha, D. & Critchley, D. R. (1998). Disruption of the talin gene compromises focal adhesion assembly in undifferentiated but not differentiated embryonic stem cells. *J Cell Biol* 142, 1121-1133.
296. Qu, A. & Leahy, D. J. (1995). Crystal structure of the I-domain from the CD11a/CD18 (LFA-1, alpha L beta 2) integrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10277-10281.
297. Quinn, M., Deering, A., Stewart, M., Cox, D., Foley, B. & Fitzgerald, D. (1999). Quantifying GPIIb/IIIa receptor binding using 2 monoclonal antibodies: discriminating abciximab and small molecular weight antagonists. *Circulation* 99, 2231-2238.
298. Raftopoulou, M. & Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265, 23-32.
299. Rajfur, Z., Roy, P., Otey, C., Romer, L. & Jacobson, K. (2002). Dissecting the link between stress fibres and focal adhesions by CALI with GFP fusion proteins. *Nat Cell Biol* 4, 286-293.
300. Reddy, K. B., Gascard, P., Price, M. G., Negrescu, E. V. & Fox, J. E. (1998). Identification of an interaction between the m-band protein skelemin and beta-integrin subunits. Colocalization of a skelemin-like protein with beta1- and beta3-integrins in non-muscle cells. *J Biol Chem* 273, 35039-35047.
301. Rees, D. J., Ades, S. E., Singer, S. J. & Hynes, R. O. (1990). Sequence and domain structure of talin. *Nature* 347, 685-689.
302. Reiske, H. R., Kao, S. C., Cary, L. A., Guan, J. L., Lai, J. F. & Chen, H. C. (1999). Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Biol Chem* 274, 12361-12366.
303. Reszka, A. A., Hayashi, Y. & Horwitz, A. F. (1992). Identification of amino acid sequences in the integrin beta 1 cytoplasmic domain implicated in cytoskeletal association. *J Cell Biol* 117, 1321-1330.
304. Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. & Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410.
305. Rietzler, M., Bittner, M., Kolanus, W., Schuster, A. & Holzmann, B. (1998). The human WD repeat protein WAIT-1 specifically interacts with the cytoplasmic tails of beta7-integrins. *J Biol Chem* 273, 27459-27466.
306. Rivelino, D., Zamir, E., Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B. & Bershadsky, A. D. (2001). Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* 153, 1175-1186.
307. Rivero, F., Furukawa, R., Fechheimer, M. & Noegel, A. A. (1999). Three actin cross-linking proteins, the 34 kDa actin-bundling protein, alpha-actinin and gelation factor (ABP-120), have both unique and redundant roles in the growth and development of Dictyostelium. *J Cell Sci* 112 (Pt 16), 2737-2751.
308. Robertson, S. P., Twigg, S. R., Sutherland-Smith, A. J., Biancalana, V., Gorlin, R. J., Horn, D., Kenwick, S. J., Kim, C. A., Morava, E., Newbury-Ecob, R., et al. (2003). Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nat Genet* 33, 487-491.
309. Rojiani, M. V., Finlay, B. B., Gray, V. & Dedhar, S. (1991). In vitro interaction of a polypeptide homologous to human Ro/SS-A antigen (calreticulin) with a highly conserved amino acid sequence in the cytoplasmic domain of integrin alpha subunits. *Biochemistry* 30, 9859-9866.

310. Rooney, M. M., Parise, L. V. & Lord, S. T. (1996). Dissecting clot retraction and platelet aggregation. Clot retraction does not require an intact fibrinogen gamma chain C terminus. *J Biol Chem* *271*, 8553-8555.
311. Rosa, J. P., Bray, P. F., Gayet, O., Johnston, G. I., Cook, R. G., Jackson, K. W., Shuman, M. A. & McEver, R. P. (1988). Cloning of glycoprotein IIIa cDNA from human erythroleukemia cells and localization of the gene to chromosome 17. *Blood* *72*, 593-600.
312. Rosa, J. P. & McEver, R. P. (1989). Processing and assembly of the integrin, glycoprotein IIb-IIIa, in HEL cells. *J Biol Chem* *264*, 12596-12603.
313. Rosales, C., O'Brien, V., Kornberg, L. & Juliano, R. (1995). Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochim Biophys Acta* *1242*, 77-98.
314. Rosenberger, G., Jantke, I., Gal, A. & Kutsche, K. (2003). Interaction of alphaPIX (ARHGEF6) with beta-parvin (PARVB) suggests an involvement of alphaPIX in integrin-mediated signaling. *Hum Mol Genet* *12*, 155-167.
315. Rottner, K., Hall, A. & Small, J. V. (1999). Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol* *9*, 640-648.
316. Ruiz, C., Liu, C. Y., Sun, Q. H., Sigaud-Fiks, M., Fressinaud, E., Muller, J. Y., Nurden, P., Nurden, A. T., Newman, P. J. & Valentin, N. (2001). A point mutation in the cysteine-rich domain of glycoprotein (GP) IIIa results in the expression of a GPIIb-IIIa (alphaIIbbeta3) integrin receptor locked in a high-affinity state and a Glanzmann thrombasthenia-like phenotype. *Blood* *98*, 2432-2441.
317. Ruoslahti, E. & Pierschbacher, M. D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* *238*, 491-497.
318. Ruoslahti, E. & Reed, J. C. (1994). Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* *77*, 477-478.
319. Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* *230*, 1350-1354.
320. Sajid, M., Hu, Z., Lele, M. & Stouffer, G. A. (2000). Protein complexes involving alpha v beta 3 integrins, nonmuscle myosin heavy chain-A, and focal adhesion kinase from in thrombospondin-treated smooth muscle cells. *J Invest Med* *48*, 190-197.
321. Sakai, T., Jove, R., Fassler, R. & Mosher, D. F. (2001). Role of the cytoplasmic tyrosines of beta 1A integrins in transformation by v-src. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 3808-3813.
322. Sakai, T., Li, S., Docheva, D., Grashoff, C., Sakai, K., Kostka, G., Braun, A., Pfeifer, A., Yurchenco, P. D. & Fassler, R. (2003). Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. *Genes Dev* *17*, 926-940.
323. Sampath, R., Gallagher, P. J. & Pavalko, F. M. (1998). Cytoskeletal interactions with the leukocyte integrin beta2 cytoplasmic tail. Activation-dependent regulation of associations with talin and alpha-actinin. *J Biol Chem* *273*, 33588-33594.
324. Savage, B., Bottini, E. & Ruggeri, Z. M. (1995). Interaction of integrin alpha IIb beta 3 with multiple fibrinogen domains during platelet adhesion. *J Biol Chem* *270*, 28812-28817.
325. Schaffner-Reckinger, E., Gouon, V., Melchior, C., Plancon, S. & Kieffer, N. (1998). Distinct involvement of beta3 integrin cytoplasmic domain tyrosine residues 747 and 759 in integrin-mediated cytoskeletal assembly and phosphotyrosine signaling. *J Biol Chem* *273*, 12623-12632.
326. Schaller, M. D., Borgman, C. A., Cobb, B. S., Vines, R. R., Reynolds, A. B. & Parsons, J. T. (1992). pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 5192-5196.
327. Schaller, M. D., Otey, C. A., Hildebrand, J. D. & Parsons, J. T. (1995). Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol* *130*, 1181-1187.
328. Schaller, M. D. (2001). Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta* *1540*, 1-21.
329. Schlaepfer, D. D. & Hunter, T. (1997). Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. *J Biol Chem* *272*, 13189-13195.
330. Schlaepfer, D. D. & Mitra, S. K. (2004). Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr Opin Genet Dev* *14*, 92-101.
331. Schmidt, J. M., Zhang, J., Lee, H. S., Stromer, M. H. & Robson, R. M. (1999). Interaction of talin with actin: sensitive modulation of filament crosslinking activity. *Arch Biochem Biophys* *366*, 139-150.
332. Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 5857-5864.
333. Schwartz, M. A., Schaller, M. D. & Ginsberg, M. H. (1995). Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* *11*, 549-599.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

334. Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. & Dowdy, S. F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285, 1569-1572.
335. Schwarze, S. R., Hruska, K. A. & Dowdy, S. F. (2000). Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol* 10, 290-295.
336. Seelig, A., Blatter, X. L., Frentzel, A. & Isenberg, G. (2000). Phospholipid binding of synthetic talin peptides provides evidence for an intrinsic membrane anchor of talin. *J Biol Chem* 275, 17954-17961.
337. Seki, N., Muramatsu, M., Sugano, S., Suzuki, Y., Nakagawara, A., Ohhira, M., Hayashi, A., Hori, T. & Saito, T. (1998). Cloning, expression analysis, and chromosomal localization of HIP1R, an isolog of huntingtin interacting protein (HIP1). *J Hum Genet* 43, 268-271.
338. Sharma, C. P., Ezzell, R. M. & Arnaout, M. A. (1995). Direct interaction of filamin (ABP-280) with the beta 2-integrin subunit CD18. *J Immunol* 154, 3461-3470.
339. Shattil, S. J., Hoxie, J. A., Cunningham, M. & Brass, L. F. (1985). Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem* 260, 11107-11114.
340. Shattil, S. J., O'Toole, T., Eigenthaler, M., Thon, V., Williams, M., Babior, B. M. & Ginsberg, M. H. (1995). Beta 3-endonexin, a novel polypeptide that interacts specifically with the cytoplasmic tail of the integrin beta 3 subunit. *J Cell Biol* 131, 807-816.
341. Shaw, S. K., Cepek, K. L., Murphy, E. A., Russell, G. J., Brenner, M. B. & Parker, C. M. (1994). Molecular cloning of the human mucosal lymphocyte integrin alpha E subunit. Unusual structure and restricted RNA distribution. *J Biol Chem* 269, 6016-6025.
342. Shibasaki, F., Fukami, K., Fukui, Y. & Takenawa, T. (1994). Phosphatidylinositol 3-kinase binds to alpha-actinin through the p85 subunit. *Biochem J* 302 (Pt 2), 551-557.
343. Shimaoka, M., Takagi, J. & Springer, T. A. (2002). Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31, 485-516.
344. Shock, D. D., Naik, U. P., Brittain, J. E., Alahari, S. K., Sondek, J. & Parise, L. V. (1999). Calcium-dependent properties of CIB binding to the integrin alphaIIb cytoplasmic domain and translocation to the platelet cytoskeleton. *Biochem J* 342 Pt 3, 729-735.
345. Smith, J. G., Walzem, R. L. & German, J. B. (1993). Liposomes as agents of DNA transfer. *Biochim Biophys Acta* 1154, 327-340.
346. Smith, J. W., Ruggeri, Z. M., Kunicki, T. J. & Cheresh, D. A. (1990). Interaction of integrins alpha v beta 3 and glycoprotein IIb-IIIa with fibrinogen. Differential peptide recognition accounts for distinct binding sites. *J Biol Chem* 265, 12267-12271.
347. Sokol, N. S. & Cooley, L. (1999). Drosophila filamin encoded by the cheerio locus is a component of ovarian ring canals. *Curr Biol* 9, 1221-1230.
348. Sosnoski, D. M., Emanuel, B. S., Hawkins, A. L., van Tuinen, P., Ledbetter, D. H., Nussbaum, R. L., Kaos, F. T., Schwartz, E., Phillips, D. & Bennett, J. S. (1988). Chromosomal localization of the genes for the vitronectin and fibronectin receptors alpha subunits and for platelet glycoproteins IIb and IIIa. *J Clin Invest* 81, 1993-1998.
349. Springer, T. A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425-434.
350. Springer, T. A. (1997). Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 65-72.
351. Springer, T. A., Jing, H. & Takagi, J. (2000). A novel Ca²⁺ binding beta hairpin loop better resembles integrin sequence motifs than the EF hand. *Cell* 102, 275-277.
352. Steimle, P. A., Hoffert, J. D., Adey, N. B. & Craig, S. W. (1999). Polyphosphoinositides inhibit the interaction of vinculin with actin filaments. *J Biol Chem* 274, 18414-18420.
353. Stossel, T. P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J. H., Noegel, A., Schleicher, M. & Shapiro, S. S. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 138-145.
354. Suh, T. T., Holmback, K., Jensen, N. J., Daugherty, C. C., Small, K., Simon, D. I., Potter, S. & Degen, J. L. (1995). Resolution of spontaneous bleeding events but failure of pregnancy in fibrinogen-deficient mice. *Genes Dev* 9, 2020-2033.
355. Sun, Q. H., Liu, C. Y., Wang, R., Paddock, C. & Newman, P. J. (2002). Disruption of the long-range GPIIIa Cys(5)-Cys(435) disulfide bond results in the production of constitutively active GPIIb-IIIa (alpha(IIb)beta(3)) integrin complexes. *Blood* 100, 2094-2101.
356. Sun, X., Skorstengaard, K. & Mosher, D. F. (1992). Disulfides modulate RGD-inhibitable cell adhesive activity of thrombospondin. *J Cell Biol* 118, 693-701.
357. Tadokoro, S., Shattil, S. J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R. C., de Pereda, J. M., Ginsberg, M. H. & Calderwood, D. A. (2003). Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 302, 103-106.

358. Takada, Y., Elices, M. J., Crouse, C. & Hemler, M. E. (1989). The primary structure of the alpha 4 subunit of VLA-4: homology to other integrins and a possible cell-cell adhesion function. *Embo J* 8, 1361-1368.
359. Takagi, J., Beglova, N., Yalamanchili, P., Blacklow, S. C. & Springer, T. A. (2001). Definition of EGF-like, closely interacting modules that bear activation epitopes in integrin beta subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11175-11180.
360. Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T. & Springer, T. A. (2002). Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 110, 599-511.
361. Takagi, J. & Springer, T. A. (2002). Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol Rev* 186, 141-163.
362. Tang, S., Gao, Y. & Ware, J. A. (1999). Enhancement of endothelial cell migration and in vitro tube formation by TAP20, a novel beta 5 integrin-modulating, PKC theta-dependent protein. *J Cell Biol* 147, 1073-1084.
363. Tapley, P., Horwitz, A., Buck, C., Duggan, K. & Rohrschneider, L. (1989). Integrins isolated from Rous sarcoma virus-transformed chicken embryo fibroblasts. *Oncogene* 4, 325-333.
364. Teramoto, H., Salem, P., Robbins, K. C., Bustelo, X. R. & Gutkind, J. S. (1997). Tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product links FcepsilonRI to the Rac1-JNK pathway. *J Biol Chem* 272, 10751-10755.
365. Tigges, U., Koch, B., Wissing, J., Jockusch, B. M. & Ziegler, W. H. (2003). The F-actin cross-linking and focal adhesion protein filamin A is a ligand and in vivo substrate for protein kinase C alpha. *J Biol Chem* 278, 23561-23569.
366. Tozer, E. C., Liddington, R. C., Sutcliffe, M. J., Smeeton, A. H. & Loftus, J. C. (1996). Ligand binding to integrin alphaIIb beta3 is dependent on a MIDAS-like domain in the beta3 subunit. *J Biol Chem* 271, 21978-21984.
367. Tozer, E. C., Baker, E. K., Ginsberg, M. H. & Loftus, J. C. (1999). A mutation in the alpha subunit of the platelet integrin alphaIIb beta3 identifies a novel region important for ligand binding. *Blood* 93, 918-924.
368. Tranqui, L. & Block, M. R. (1995). Intracellular processing of talin occurs within focal adhesions. *Exp Cell Res* 217, 149-156.
369. Trave, G., Pastore, A., Hyvonen, M. & Saraste, M. (1995). The C-terminal domain of alpha-spectrin is structurally related to calmodulin. *Eur J Biochem* 227, 35-42.
370. Travis, M. A., van der Flier, A., Kammerer, R. A., Paul Mould, A., Sonnenberg, A. & Humphries, M. J. (2004). Interaction of filamin A with the integrin beta7 cytoplasmic domain: role of alternative splicing and phosphorylation. *FEBS Lett* 569, 185-190.
371. Trub, T., Choi, W. E., Wolf, G., Ottinger, E., Chen, Y., Weiss, M. & Shoelson, S. E. (1995). Specificity of the PTB domain of Shc for beta turn-forming pentapeptide motifs amino-terminal to phosphotyrosine. *J Biol Chem* 270, 18205-18208.
372. Tsuboi, S. (2002). Calcium integrin-binding protein activates platelet integrin alpha IIb beta 3. *J Biol Chem* 277, 1919-1923.
373. Tu, Y., Kucik, D. F. & Wu, C. (2001a). Identification and kinetic analysis of the interaction between Nck-2 and DOCK180. *FEBS Lett* 491, 193-199.
374. Tu, Y., Huang, Y., Zhang, Y., Hua, Y. & Wu, C. (2001b). A new focal adhesion protein that interacts with integrin-linked kinase and regulates cell adhesion and spreading. *J Cell Biol* 153, 585-598.
375. Tu, Y., Liang, L., Frank, S. J. & Wu, C. (2001c). Src homology 3 domain-dependent interaction of Nck-2 with insulin receptor substrate-1. *Biochem J* 354, 315-322.
376. Tuckwell, D. S. & Humphries, M. J. (1997). A structure prediction for the ligand-binding region of the integrin beta subunit: evidence for the presence of a von Willebrand factor A domain. *FEBS Lett* 400, 297-303.
377. Turner, C. E. & Burridge, K. (1989). Detection of metavinculin in human platelets using a modified talin overlay assay. *Eur J Cell Biol* 49, 202-206.
378. Turner, C. E., Brown, M. C., Perrotta, J. A., Riedy, M. C., Nikolopoulos, S. N., McDonald, A. R., Bagrodia, S., Thomas, S. & Leventhal, P. S. (1999). Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *J Cell Biol* 145, 851-863.
379. Ulmer, T. S., Yaspan, B., Ginsberg, M. H. & Campbell, I. D. (2001). NMR analysis of structure and dynamics of the cytosolic tails of integrin alpha IIb beta 3 in aqueous solution. *Biochemistry* 40, 7498-7508.
380. Ulmer, T. S., Calderwood, D. A., Ginsberg, M. H. & Campbell, I. D. (2003). Domain-specific interactions of talin with the membrane-proximal region of the integrin beta3 subunit. *Biochemistry* 42, 8307-8312.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

381. Vallar, L., Melchior, C., Plancon, S., Drobecq, H., Lippens, G., Regnault, V. & Kieffer, N. (1999). Divalent cations differentially regulate integrin alphaIIb cytoplasmic tail binding to beta3 and to calcium- and integrin-binding protein. *J Biol Chem* 274, 17257-17266.
382. van der Flier, A. & Sonnenberg, A. (2001). Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta* 1538, 99-117.
383. Vinogradova, O., Haas, T., Plow, E. F. & Qin, J. (2000). A structural basis for integrin activation by the cytoplasmic tail of the alpha IIb-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1450-1455.
384. Vinogradova, O., Velyvis, A., Velyviene, A., Hu, B., Haas, T., Plow, E. & Qin, J. (2002). A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell* 110, 587-597.
385. Vinogradova, O., Vaynberg, J., Kong, X., Haas, T. A., Plow, E. F. & Qin, J. (2004). Membrane-mediated structural transitions at the cytoplasmic face during integrin activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4094-4099.
386. Vocero-Akbani, A. M., Heyden, N. V., Lissy, N. A., Ratner, L. & Dowdy, S. F. (1999). Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. *Nat Med* 5, 29-33.
387. Volberg, T., Geiger, B., Kam, Z., Pankov, R., Simcha, I., Sabanay, H., Coll, J. L., Adamson, E. & Ben-Ze'ev, A. (1995). Focal adhesion formation by F9 embryonal carcinoma cells after vinculin gene disruption. *J Cell Sci* 108 (Pt 6), 2253-2260.
388. Wanker, E. E., Rovira, C., Scherzinger, E., Hasenbank, R., Walter, S., Tait, D., Colicelli, J. & Lehrach, H. (1997). HIP-I: a huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. *Hum Mol Genet* 6, 487-495.
389. Wary, K. K., Mariotti, A., Zurzolo, C. & Giancotti, F. G. (1998). A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 94, 625-634.
390. Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T. & Narumiya, S. (1999). Cooperation between mDial and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol* 1, 136-143.
391. Watson, K. & Edwards, R. J. (1999). HIV-1-trans-activating (Tat) protein: both a target and a tool in therapeutic approaches. *Biochem Pharmacol* 58, 1521-1528.
392. Webb, D. J., Donais, K., Whitmore, L. A., Thomas, S. M., Turner, C. E., Parsons, J. T. & Horwitz, A. F. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 6, 154-161.
393. Weber, I., Niewohner, J., Du, A., Rohrig, U. & Gerisch, G. (2002). A talin fragment as an actin trap visualizing actin flow in chemotaxis, endocytosis, and cytokinesis. *Cell Motil Cytoskeleton* 53, 136-149.
394. Weekes, J., Barry, S. T. & Critchley, D. R. (1996). Acidic phospholipids inhibit the intramolecular association between the N- and C-terminal regions of vinculin, exposing actin-binding and protein kinase C phosphorylation sites. *Biochem J* 314 (Pt 3), 827-832.
395. Wegner, A. (1976). Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol* 108, 139-150.
396. Wehrle-Haller, B. & Imhof, B. A. (2003). Integrin-dependent pathologies. *J Pathol* 200, 481-487.
397. Weljie, A. M., Hwang, P. M. & Vogel, H. J. (2002). Solution structures of the cytoplasmic tail complex from platelet integrin alpha IIb- and beta 3-subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5878-5883.
398. Wencel-Drake, J. D., Plow, E. F., Kunicki, T. J., Woods, V. L., Keller, D. M. & Ginsberg, M. H. (1986). Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses. *Am J Pathol* 124, 324-334.
399. Wesp, A., Hicke, L., Palecek, J., Lombardi, R., Aust, T., Munn, A. L. & Riezman, H. (1997). End4p/Sla2p interacts with actin-associated proteins for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 8, 2291-2306.
400. White, D. E., Cardiff, R. D., Dedhar, S. & Muller, W. J. (2001). Mammary epithelial-specific expression of the integrin-linked kinase (ILK) results in the induction of mammary gland hyperplasias and tumors in transgenic mice. *Oncogene* 20, 7064-7072.
401. Williams, M. J., Hughes, P. E., O'Toole, T. E. & Ginsberg, M. H. (1994). The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains. *Trends Cell Biol* 4, 109-112.
402. Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copsey, T. & Cooper, J. (1994). 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* 368, 32-38.
403. Winkler, J., Lunsdorf, H. & Jockusch, B. M. (1997). Energy-filtered electron microscopy reveals that talin is a highly flexible protein composed of a series of globular domains. *Eur J Biochem* 243, 430-436.
404. Witke, W., Schleicher, M. & Noegel, A. A. (1992). Redundancy in the microfilament system: abnormal development of *Dictyostelium* cells lacking two F-actin cross-linking proteins. *Cell* 68, 53-62.

405. Wixler, V., Laplantine, E., Geerts, D., Sonnenberg, A., Petersohn, D., Eckes, B., Paulsson, M. & Aumailley, M. (1999). Identification of novel interaction partners for the conserved membrane proximal region of alpha-integrin cytoplasmic domains. *FEBS Lett* *445*, 351-355.
406. Wixler, V., Geerts, D., Laplantine, E., Westhoff, D., Smyth, N., Aumailley, M., Sonnenberg, A. & Paulsson, M. (2000). The LIM-only protein DRAL/FHL2 binds to the cytoplasmic domain of several alpha and beta integrin chains and is recruited to adhesion complexes. *J Biol Chem* *275*, 33669-33678.
407. Woodside, D. G., Obergfell, A., Leng, L., Wilsbacher, J. L., Miranti, C. K., Brugge, J. S., Shattil, S. J. & Ginsberg, M. H. (2001). Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin beta cytoplasmic domains. *Curr Biol* *11*, 1799-1804.
408. Woodside, D. G., Obergfell, A., Talapatra, A., Calderwood, D. A., Shattil, S. J. & Ginsberg, M. H. (2002). The N-terminal SH2 domains of Syk and ZAP-70 mediate phosphotyrosine-independent binding to integrin beta cytoplasmic domains. *J Biol Chem* *277*, 39401-39408.
409. Wouters, F. S., Bastiaens, P. I., Wirtz, K. W. & Jovin, T. M. (1998). FRET microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes. *Embo J* *17*, 7179-7189.
410. Wu, C. & Dedhar, S. (2001). Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *J Cell Biol* *155*, 505-510.
411. Xi, X., Bodnar, R. J., Li, Z., Lam, S. C. & Du, X. (2003). Critical roles for the COOH-terminal NITY and RGT sequences of the integrin beta3 cytoplasmic domain in inside-out and outside-in signaling. *J Cell Biol* *162*, 329-339.
412. Xiao, T., Takagi, J., Collier, B. S., Wang, J. H. & Springer, T. A. (2004). Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature*.
413. Xing, B., Jedsadayamata, A. & Lam, S. C. (2001). Localization of an integrin binding site to the C terminus of talin. *J Biol Chem* *276*, 44373-44378.
414. Xiong, J. P., Li, R., Essafi, M., Stehle, T. & Arnaout, M. A. (2000). An isoleucine-based allosteric switch controls affinity and shape shifting in integrin CD11b A-domain. *J Biol Chem* *275*, 38762-38767.
415. Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D. L., Joachimiak, A., Goodman, S. L. & Arnaout, M. A. (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* *294*, 339-345.
416. Xiong, J. P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S. L. & Arnaout, M. A. (2002). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* *296*, 151-155.
417. Xiong, J. P., Stehle, T., Goodman, S. L. & Arnaout, M. A. (2003). New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood* *102*, 1155-1159.
418. Xiong, J. P., Stehle, T., Goodman, S. L. & Amin Arnaout, M. (2004). A novel adaptation of the integrin PSI domain revealed from its crystal structure. *J Biol Chem*.
419. Xu, W., Coll, J. L. & Adamson, E. D. (1998). Rescue of the mutant phenotype by reexpression of full-length vinculin in null F9 cells; effects on cell locomotion by domain deleted vinculin. *J Cell Sci* *111* (Pt *11*), 1535-1544.
420. Yamada, K. M. & Miyamoto, S. (1995). Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol* *7*, 681-689.
421. Yamazaki, M., Furuike, S. & Ito, T. (2002). Mechanical response of single filamin A (ABP-280) molecules and its role in the actin cytoskeleton. *J Muscle Res Cell Motil* *23*, 525-534.
422. Yan, B. & Smith, J. W. (2000). A redox site involved in integrin activation. *J Biol Chem* *275*, 39964-39972.
423. Yan, B., Calderwood, D. A., Yaspan, B. & Ginsberg, M. H. (2001). Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem* *276*, 28164-28170.
424. Yan, B. & Smith, J. W. (2001). Mechanism of integrin activation by disulfide bond reduction. *Biochemistry* *40*, 8861-8867.
425. Ylanne, J., Huuskonen, J., O'Toole, T. E., Ginsberg, M. H., Virtanen, I. & Gahmberg, C. G. (1995). Mutation of the cytoplasmic domain of the integrin beta 3 subunit. Differential effects on cell spreading, recruitment to adhesion plaques, endocytosis, and phagocytosis. *J Biol Chem* *270*, 9550-9557.
426. Zaidel-Bar, R., Ballestrem, C., Kam, Z. & Geiger, B. (2003). Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci* *116*, 4605-4613.
427. Zaidi, T. N., McIntire, L. V., Farrell, D. H. & Thiagarajan, P. (1996). Adhesion of platelets to surface-bound fibrinogen under flow. *Blood* *88*, 2967-2972.
428. Zamir, E. & Geiger, B. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* *114*, 3583-3590.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

429. Zent, R., Fenczik, C. A., Calderwood, D. A., Liu, S., Dellos, M. & Ginsberg, M. H. (2000). Class- and splice variant-specific association of CD98 with integrin beta cytoplasmic domains. *J Biol Chem* 275, 5059-5064.
430. Zervas, C. G., Gregory, S. L. & Brown, N. H. (2001). *Drosophila* integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane. *J Cell Biol* 152, 1007-1018.
431. Zhang, J., Robson, R. M., Schmidt, J. M. & Stromer, M. H. (1996). Talin can crosslink actin filaments into both networks and bundles. *Biochem Biophys Res Commun* 218, 530-537.
432. Zhang, X., Chattopadhyay, A., Ji, Q. S., Owen, J. D., Ruest, P. J., Carpenter, G. & Hanks, S. K. (1999). Focal adhesion kinase promotes phospholipase C-gamma1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9021-9026.
433. Zhang, X. A. & Hemler, M. E. (1999). Interaction of the integrin beta1 cytoplasmic domain with ICAP-1 protein. *J Biol Chem* 274, 11-19.
434. Zhang, Y., Chen, K., Guo, L. & Wu, C. (2002). Characterization of PINCH-2, a new focal adhesion protein that regulates the PINCH-1-ILK interaction, cell spreading, and migration. *J Biol Chem* 277, 38328-38338.
435. Zhao, Z. S., Manser, E., Loo, T. H. & Lim, L. (2000). Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol Cell Biol* 20, 6354-6363.
436. Zucker, M. B. & Masiello, N. C. (1984). Platelet aggregation caused by dithiothreitol. *Thromb Haemost* 51, 119-124.

